

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nilza do Carmo Fontes

**CARACTERIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS DE N-GLICANOS DE
GLICOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA EM
DISTÚRBIOS CONGÊNTOS DE GLICOSILAÇÃO TIPO II**

Brasília

2016

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

NILZA DO CARMO FONTES

CARACTERIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS DE N-GLICANOS DE GLICOPROTEÍNAS
PLASMÁTICAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA EM DISTÚRBIOS
CONGÊNITOS DE GLICOSILAÇÃO TIPO II

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Dr^a Angélica Amorim Amato

Co-orientador: Dr Guilherme Dotto Brand

Brasília

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e especialmente:

À Dr. Jaime Moritz Brum, sem a ajuda do mesmo este trabalho não seria possível.

À DR^a Mônica de Magalhães Machado Navarro, Dr^a Ana Luiza Villaça Coelho, Dr^a Fernanda Jordão Pinto Marques e Dr. Fauster de Oliveira Bandeira Lopes pelo incentivo e apoio.

À Ana Carla Gomes das Chagas, Silvana Peres Vieira e Daniel Gonçalves Macambira pela disponibilidade e atenção.

À Sandro Barbosa de Oliveira e Márcio Antônio da Silva Moura pela assistência prestada.

Aos amigos do laboratório de citogenética e em especial à Charlene Gomes Pimentel Rodrigo dos Santos pelo carinho.

E à Rede SARAH de Hospitais de Reabilitação, pela oportunidade.

RESUMO

Os distúrbios congênitos de glicosilação tipo II (CDG II) são doenças graves, multissistêmicas, devidos a mutações deletérias em genes que codificam proteínas que mantêm a integridade do complexo de Golgi e de outros componentes que participam do processo de N-glicosilação. Este representa modificação pós-traducional de proteínas que dá origem às estruturas de N-glicanos, que são essenciais para o funcionamento normal do organismo.

Para avaliação do desempenho da espectrometria de massa no diagnóstico dos CDG II, foi realizada análise e comparação por espectrometria de massa, de estruturas de N-glicanos das moléculas de glicoproteínas plasmáticas de indivíduos portadores e não portadores de distúrbios congênitos de glicosilação tipo II e verificou-se que as diferenças entre os dois grupos foram em maior parte quantitativas. Entretanto, um subtipo de CDG II (MAN1B1-CDG) levou a produção e acúmulo de N-glicanos diferenciais que permitem um direcionamento do diagnóstico molecular.

Através de diferenças quantitativas, a análise e estudo das estruturas de N-glicanos acumuladas estreita o número de genes candidatos ao diagnóstico molecular, auxiliando na identificação destes distúrbios, que não apresentam sintomas clínicos nem glicobiomarcas específicos, e se confundem clinicamente com outras doenças metabólicas.

Este trabalho é pioneiro no Brasil e evidenciou a importância da espectrometria de massa no auxílio ao diagnóstico de portadores de distúrbios congênitos de glicosilação tipo II.

Palavras-chave: CDG tipo II; CDG; N-glicanos; N-glicosilação; focalização isoelétrica; espectrometria de massa; glicosilação.

ABSTRACT

Congenital Disorders of Glycosylation type II (CDG II) comprise a group of severe, multisystem diseases caused by mutations in genes responsible for maintaining the integrity of Golgi apparatus and of other components involved in N-glycosylation processing, i.e, post-translational modifications, which result in N-glycan structures.

We performed analyses of N-glycan structures of plasma glycoproteins of CDG II patients and healthy controls, in order to evaluate the performance of mass spectrometry in the diagnosis of these diseases. Most of the differences between both groups of individuals were quantitative. One of the CDG II subtypes (MAN1B1-CDG) led to the accumulation of abnormal N-glycans, which allowed diagnosis, not yet confirmed by molecular methods.

Analysis and characterization of accumulated N-glycan structures narrow the number of candidate genes to be considered in the diagnosis. This helps in the identification of these diseases, because the definite diagnostic is not possible by clinical features and there are no specific biomarkers.

To the best of our knowledge, this is the first mass spectrometry-based study in Brazil aiming the diagnosis of these disorders. It also highlights the importance of mass spectrometry in the diagnosis of CDG II.

Keywords: CDG type II; CDGs; N-glycans; Glycosylation; N-glycosylation; Isoelectric focusing; mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Síntese do precursor do N-glicano.....	3
Figura 2: Processamento e maturação do N-glicano.....	4
Figura 3: Tipos de N-glicanos.....	5
Figura 4: Estrutura da transferrina.....	12
Figura 5: Focalização isoeétrica da transferrina sérica.....	13
Figura 6: IEF da transferrina mostrando polimorfismo.....	14
Figura 7: Análise em espectrômetro de massa.....	16
Figura 8: Espectro de massa das estruturas de N-glicanos plasmáticos de indivíduo controle.....	17
Figura 9: Espectro com padrão de N-glicanos em indivíduos controle	30
Figura 10: Espectro de massa das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 1.....	31
Figura 11: Espectro de massa das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 2.....	32
Figura 12: Espectro de massa das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 3.....	33
Figura 13: Espectro de massa das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 4.....	35
Figura 14: Espectro de massa das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 5.....	37
Figura 15: Espectro de massa das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 6.....	38
Figura 16: Espectro de massa das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 7.....	39
Figura 17: Espectro de massa das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 8.....	40
Figura 18: Espectro de massa das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 9.....	41
Figura 19: Espectro de massa das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 10.....	42

Figura 20: Espectro de massa das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 11.....	43
Figura 21: Espectro de massa das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 12.....	45
Figura 22: Espectro de massa das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 13.....	46
Figura 23: Espectro de massa das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 14.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARCL 2b	Cutis laxa autossômica recessiva tipo 2b
CDG	Distúrbios Congênitos de Glicosilação
COG	Complexo oligomérico conservado Golgi
DHB	Ácido dihidróxibenzoico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
Dol-P	Dolicol fosfato
Glc	Glicose
GlcNac	N-acetilglicosamina
GlcNAcT-1	Enzima N-acetilglicosaminatransferase I
GlcNAcT-II	Enzima N-acetilglicosaminatransferase II
IAA	Iodoacetamida
IEF	Focalização Isoelétrica
LLO	Oligossacarídeo ligado ao lipídeo
Man	Manose
MS	Espectrometria de massa
NaOH	Hidróxido de sódio
P	Fosfato
RE	Retículo endoplasmático
Tf	Transferrina
UDP	Uridina difosfato

SUMÁRIO

	Pág
1 Introdução.....	1
1.1 N-Glicosilação.....	2
1.2 Distúrbios Congênitos de Glicosilação (CDG).....	6
1.2.1 Distúrbios Congênitos de Glicosilação Tipo II (CDG II).....	7
1.2.1.1 Nomenclatura.....	7
1.2.1.2 Mecanismos de Alteração da N-glicosilação.....	7
1.2.1.2.1 Deficiência Funcional de Enzimas.....	7
MGAT2-CDG (CDG-IIa).....	8
MOGS-CDG (CDG-IIb).....	8
B4GALT1-CDG (CDG-IIc).....	8
MAN1B1-CDG.....	9
1.2.1.2.2 Disfunção do Complexo de Golgi e de	
Transportadores.....	9
SLC35C1-CDG (CDG-IIc).....	9
SLC35A1-CDG (CDG-IIf).....	9
SLC35A2-CDG (CDG-IIg).....	9
COG7-CDG (CDG-IIe).....	10
ATP6V0A2-CDG.....	10
TMEM165-CDG (CDG-IIk).....	10
1.3 Diagnóstico de Distúrbios Congênitos da Glicosilação.....	11
1.3.1 Focalização isoeletrica da transferrina (Tf IEF).....	11
1.3.2 Espectrometria de massa.....	14
2 Objetivos.....	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.1 Objetivos específicos.....	18
3 Materiais e Métodos.....	19
3.1 Delineamento.....	19
3.2 Critérios de inclusão e de exclusão.....	19
3.3 Reagentes.....	20
3.4 Amostra biológica.....	20
3.4.1 Purificação das Estruturas de N-glicanos para Análise por	
MS.....	20

3.4.2 Análise da Amostra no Espectrômetro de Massa	23
3.5 Considerações éticas.....	23
3.6 Análise dos resultados.....	23
4 Resultados.....	28
4.1 Análise qualitativa.....	28
4.2 Análise quantitativa.....	29
4.3 Padrão de N-glicanos em indivíduos controles.....	30
4.4 Amostras de pacientes.....	31
4.4.1 Paciente 1.....	31
4.4.2 Paciente 2.....	32
4.4.3 Paciente 3.....	33
4.4.4 Paciente 4.....	35
4.4.5 Paciente 5.....	37
4.4.6 Paciente 6.....	38
4.4.7 Paciente 7.....	39
4.4.8 Paciente 8.....	40
4.4.9 Paciente 9.....	41
4.4.10 Paciente 10.....	42
4.4.11 Paciente 11.....	43
4.4.12 Paciente 12.....	45
4.4.13 Paciente 13.....	46
4.4.14 Paciente 14.....	48
5 Discussão.....	49
5.1 MAN1B1-CDG.....	50
5.2 ATP6V0A2-CDG.....	52
5.3 PYCR1.....	52
5.4 Casos sem diagnóstico.....	53
6 Conclusões.....	57
7 Referências Bibliográficas.....	58
8 Apêndices.....	65
Apêndice A.....	65
Apêndice B.....	67
Apêndice C.....	69
Apêndice D.....	70
Apêndice E.....	71
Apêndice F.....	72
Apêndice G.....	86
Apêndice H.....	87
9 Anexos.....	88
Anexo A.....	88
Anexo B.....	98

1 INTRODUÇÃO

A diferença de complexidade entre seres humanos e outros animais não é explicada apenas pelo tamanho do genoma de cada espécie, mas também pela interação entre classes de moléculas, incluindo ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídeos. Esta diversidade é possível através de modificações pós-traducionais que aumentam o repertório de formas maduras das proteínas com a introdução de grupos funcionais através de reações como carboxilação, hidroxilação, acetilação, fosforilação, metilação, ubiquitinação, oxidação e glicosilação que é um conjunto de reações sequenciais que leva à formação de glicoconjugados, entre os quais se destacam as glicoproteínas e glicolipídeos. Os glicanos (estruturas compostas por carboidratos) desses glicoconjugados possuem papel biológico importante por recobrirem toda a superfície das células e estarem presentes em grande parte de proteínas secretadas, promovendo interações célula-célula e célula-meio, que são críticas para o desenvolvimento e função de organismos multicelulares, mantendo padrões específicos para diferentes fases do desenvolvimento, diferentes tecidos e diferentes estados fisiológicos^{1,3,18}.

Existem diferentes tipos de glicosilação, e aproximadamente 1 a 2% do genoma humano estão envolvidos na codificação de enzimas responsáveis pela síntese e processamento de glicanos¹. As duas principais vias são a N-glicosilação e O-glicosilação, nas quais os glicanos das glicoproteínas estão ligados covalentemente ao nitrogênio do grupo amino do aminoácido asparagina e ao oxigênio do grupo hidroxila do aminoácido treonina ou serina respectivamente^{2,7}. Neste estudo, serão abordados os distúrbios da N-glicosilação. A presença de mutações deletérias nos genes que codificam as enzimas e outras proteínas envolvidas no processo de glicosilação resulta nos Distúrbios Congênitos de Glicosilação (CDG; *Congenital Disorders of Glycosylation*, em inglês), anteriormente denominados síndromes de glicoproteína deficiente em carboidrato (CDGS; *Carbohydrate-Deficient Glycoprotein Syndromes*, em inglês)⁴.

Os CDG são doenças raras, bioquímica e clinicamente heterogêneas, que se devem à deficiência na biossíntese e metabolismo dos glicanos. Desde o reconhecimento da primeira forma de CDG, em 1980, já foram descritos vários subtipos. O diagnóstico preciso de CDG é um grande desafio, devido à ampla

apresentação de sinais clínicos (que dificulta a definição de características clínicas dessas doenças), às centenas de genes relacionados e à ausência de uma glicobiomarca específica. O teste utilizado para a triagem de indivíduos possivelmente afetados é a focalização isoelétrica (IEF, *isoelectric focusing*, em inglês) da transferrina sérica, embora este teste não detecte todos os casos¹.

O diagnóstico de alguns subtipos de CDG pode ser feito por dosagens de atividade enzimática e/ou sequenciamento gênico, entretanto, para vários subtipos ainda não foram identificadas as enzimas ou genes responsáveis. Nestes casos, a análise estrutural dos N-glicanos por espectrometria de massa pode auxiliar nos estudos de vias biossintéticas, indicar genes candidatos e/ou promover novos *insights* sobre os processos envolvidos na N-glicosilação^{2,5,6}.

1.1 N-GLICOSILAÇÃO

A maioria das proteínas plasmáticas sofre modificações pós-traducionais, uma delas é a glicosilação, que é um conjunto de reações bioquímicas sequenciais com o objetivo de sintetizar estruturas de glicanos (macromoléculas compostas por carboidratos), as quais se ligam covalentemente às proteínas formando as glicoproteínas. Estes glicanos são formados por monossacarídeos como N-acetilglicosamina, manose, galactose e ácido siálico, ligados ao nitrogênio do aminoácido asparagina das proteínas. As glicoproteínas possuem variáveis números de sítios de N-glicosilação, O-glicosilação ou ambos. Em humanos, os distúrbios congênitos de glicosilação mais conhecidos são os da via da N-glicosilação^{2,8,14}.

A biossíntese das estruturas de N-glicanos compreende a síntese, transferência e processamento do glicano em três compartimentos celulares: citosol, retículo endoplasmático (RE) e complexo de Golgi. Estes processos têm início no citosol, em uma molécula de dolicol-fosfato (lipídeo preso à membrana do RE), ao qual é acrescentado uma molécula de N-acetilglicosamina-fosfato. Sequencialmente, são incorporadas uma molécula de N-acetilglicosamina e cinco moléculas de manose, formando o oligossacarídeo ligado ao lipídeo (LLO) na face citosólica da membrana do RE. Por ação de uma enzima flipase, o LLO é transferido para o lúmen do RE, onde quatro moléculas de manoses são acrescentadas. A adição de cada monossacarídeo é feita por enzimas específicas; glicosiltransferases acrescentam três moléculas de glicose ao LLO, dando origem

ao precursor maduro do N-glicano, composto por quatorze monossacarídeos. Este precursor é, então, transferido para o aminoácido asparagina em uma sequência consenso (Asn-X-Ser/Thr; onde X pode ser qualquer aminoácido, exceto prolina) da proteína nascente, finalizando a primeira fase da N-glicosilação (figura 1) ^{2,8,9}.

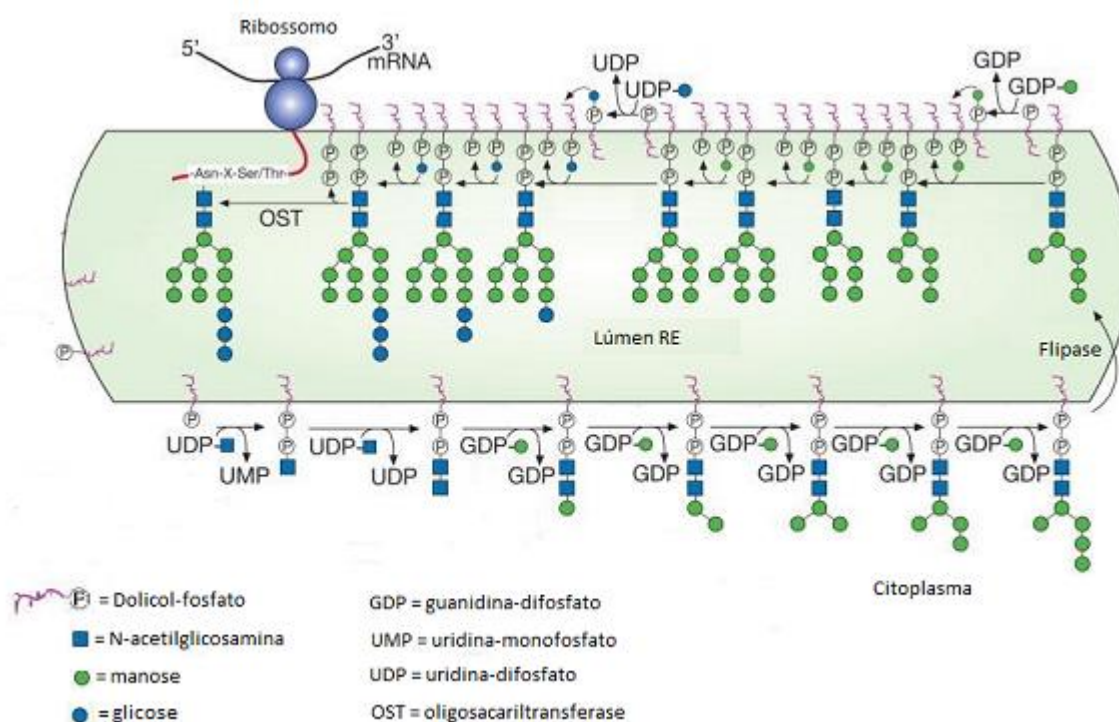


Fig. 1 - Síntese do precursor do N-glicano (dolicol-P-P-GlcNAc₂Man₉Glc₃), adaptado⁹.

Após a transferência do LLO para a proteína e ainda no RE, inicia-se o processamento do glicano (figura 2), com a remoção das moléculas de glicose (pelas alfa-glicosidases I e II) e uma molécula de manose (pela alfa-manosidase I). A proteína é então direcionada ao complexo de Golgi, onde mais moléculas de manose são removidas e outras moléculas de N-acetilglicosamina, fucose, galactose e ácido siálico são acrescentadas. O ácido siálico na posição terminal confere carga elétrica negativa à estrutura do glicano, que maduro apresenta um núcleo comum trimanosil (Man₃GlcNAc₂Asn) ^{8,9}.

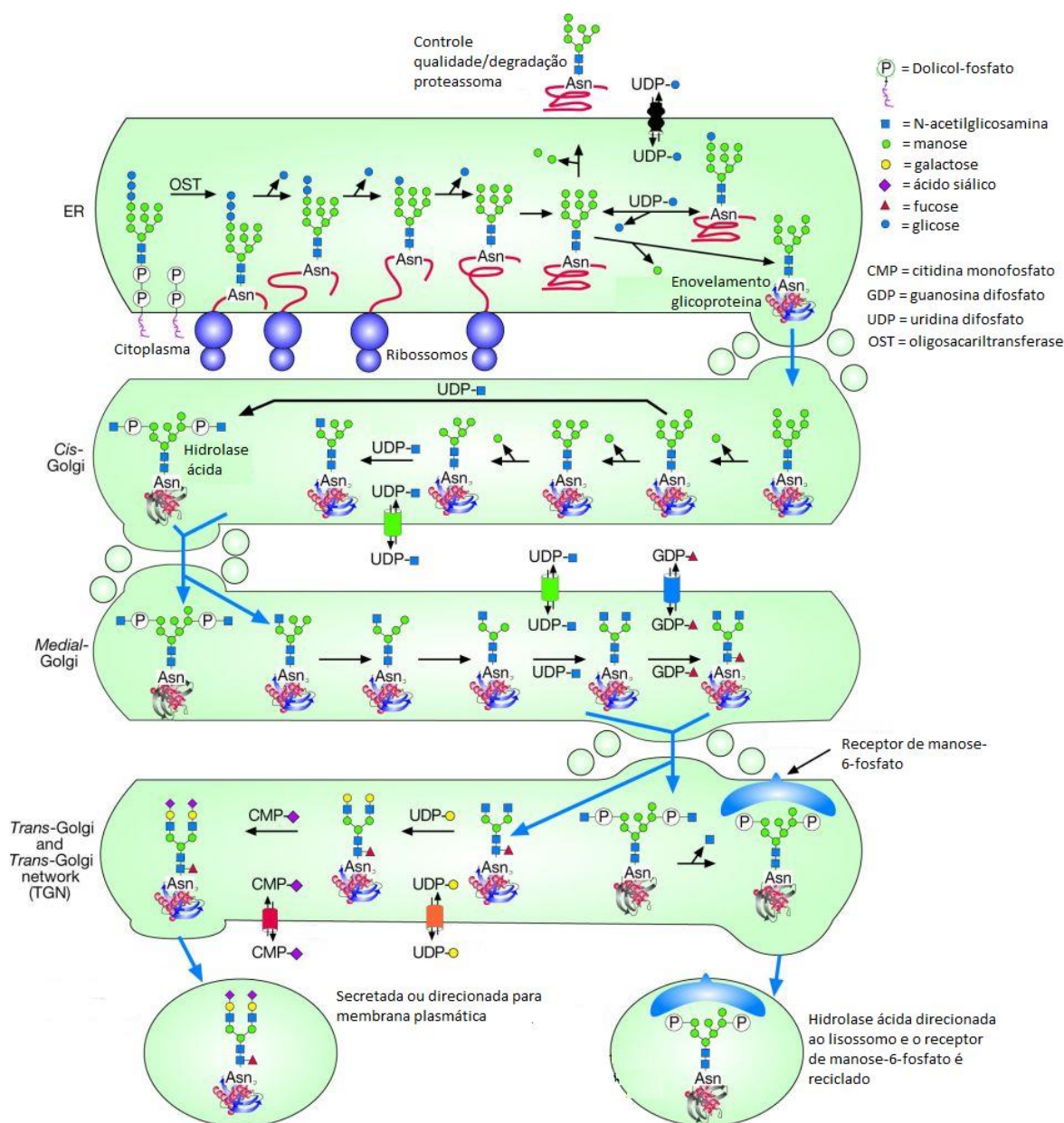


Fig. 2 - Processamento e maturação do N-glicano após a transferência do precursor para a proteína, adaptado⁹.

Como resultado da N-glicosilação, todo N-glicano apresenta um núcleo comum de onde surgem as ramificações (também denominadas antenas). Os N-glicanos são classificados em três tipos (figura 3)^{9,14}.

- 1) Oligomanosídico: no qual somente moléculas de manose são ligadas ao núcleo comum.

- 2) Complexo: no qual as duas ramificações (antenas) ligadas ao núcleo comum já apresentam moléculas de N-acetilglicosamina.
- 3) Híbrido: no qual somente moléculas de manose são ligadas ao resíduo de manose do núcleo comum na posição alfa1-6 e uma ou duas ramificações (antenas) são ligadas ao resíduo de manose do núcleo comum na posição alfa1-3.

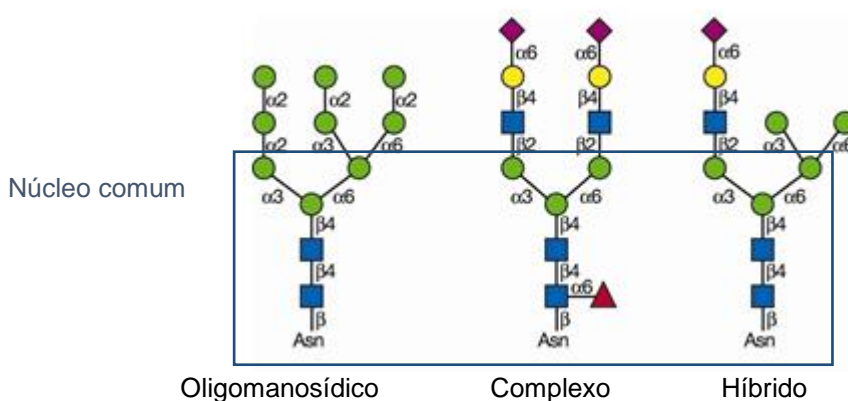


Fig. 3 - Tipos de N-glicanos. Os N-glicanos presentes em glicoproteínas maduras são de três tipos: oligomanosídico, complexo e híbrido ⁹.

Estes N-glicanos se dividem em duas grandes categorias quanto às suas propriedades biológicas:

- 1) Propriedades estruturais (os glicanos ligados aos proteoglicanos, por exemplo, são importantes para a manutenção da estrutura, porosidade e integridade tecidual) e modulatórias (modulam interações entre proteínas ativando e/ou potencializando suas funções).
- 2) Propriedades de serem reconhecidos de forma específica por outras moléculas, mais comumente por proteínas. Estas proteínas se subdividem em dois grandes grupos: proteínas que se ligam ao glicano de forma intrínseca (proteínas que reconhecem glicanos do mesmo organismo) e de proteínas que se ligam ao glicano de forma extrínseca (proteínas que reconhecem glicanos de organismos diferentes). As proteínas que se ligam ao glicano de forma intrínseca medeiam interações célula-célula, reconhecem moléculas extracelulares e podem também reconhecer glicanos na mesma célula, enquanto proteínas que reconhecem glicanos de forma extrínseca compreendem adesinas de microorganismos

patogênicos, aglutininas ou toxinas, além de relações de simbiose (por exemplo bactérias intestinais) ^{11,19}.

Baseado nestas propriedades biológicas, os glicanos apresentam funções como crescimento e desenvolvimento celular, migração celular, reconhecimento e adesão célula-célula. Conferem também resistência à digestão por proteases, estabilidade e controle de dobramento de proteínas, mecanismos de defesa e antigenicidade, entre outras ¹¹.

1.2 DISTÚRBIOS CONGÊNITOS DE GLICOSILAÇÃO

CDG são doenças genéticas herdadas de forma autossômica recessiva na maioria dos casos, causadas por mutações deletérias em genes que levam a deficiências nas reações bioquímicas de glicosilação^{1,24}.

Estas doenças apresentam amplo espectro de características clínicas o que torna o diagnóstico difícil. O desenvolvimento de diferentes órgãos é afetado, especialmente certas regiões do cérebro, trato gastrointestinal, fígado, sistema visual e sistema imunológico ⁴. Desde o reconhecimento da primeira forma mais de cem tipos de CDG foram identificados (anexo A)¹⁴ com um grande número descrito nos últimos anos, devido ao desenvolvimento de novas técnicas que combinam glicobiologia e sequenciamento de nova geração¹³.

Os portadores de CDG apresentam mais de um dos seguintes sinais clínicos: atraso de desenvolvimento, deficiência mental, hipotonia, hipoplasia cerebelar, hipotrofia do corpo caloso, atraso de mielinização, convulsões, epilepsia, ataxia, acidente vascular cerebral, atraso de crescimento, disfunção hepática, distúrbios de coagulação, dismorfismos, osteopenia, cifose, escoliose, estrabismo, retinite pigmentosa, atrofia óptica, ictiose, síndrome nefrótica, infecções recorrentes, cardiomiopatia, neuropatia periférica e distúrbios endócrinos. Muitos destes sinais são encontrados em pacientes com outras doenças metabólicas, entretanto, os pacientes com CDG apresentam processo anormal de glicosilação como causa dos achados. Os CDG que envolvem a via da N-glicosilação podem ser detectados pelo estudo da transferrina plasmática por IEF. Esta proteína possui dois sítios de N-glicosilação com estruturas de glicanos sializados em cada sítio, que pela IEF se revela em isoformas que irão configurar padrões característicos, classificando os CDG em dois tipos, tipo I e tipo II.

1.2.1 Distúrbios Congênitos de Glicosilação Tipo II (CDG II)

Os CDG II envolvem a via da N-glicosilação e são relacionados ao processamento e rearranjo do LLO ligado à proteína nascente no RE e complexo de Golgi. Ocorrem devido a mutações em genes que codificam glicosidases e glicosiltransferases, que vão levar a desordens em qualquer etapa do processo de N-glicosilação, por deficiência funcional das enzimas ou mutações em genes que codificam transportadores de monossacarídeos ativados e proteínas citoplasmáticas, que fazem o tráfego de componentes da glicosilação para o complexo de Golgi e dentro desta organela, levando a desordens em mais de uma via de glicosilação e em múltiplas etapas da N-glicosilação, devido à disfunção do complexo de Golgi^{4,6}.

1.2.1.1 Nomenclatura

A nomenclatura recomendada para os CDG inclui o nome do gene envolvido, seguido do termo CDG. A nomenclatura antiga está apresentada no presente documento entre parênteses. Nela, os subtipos eram descritos com letras minúsculas em ordem alfabética, indicando a sequência em que foram identificados. Os CDG com alteração genética ainda não esclarecida são classificados como CDG Ix ou CDG Iix^{4,8,13}.

1.2.1.2 Mecanismos de Alteração da N-glicosilação

1.2.1.2.1 Deficiência Funcional de Enzimas

As glicosidases e glicosiltransferases encontram-se localizadas em compartimentos distintos e específicos do complexo de Golgi, o que permite reações sequenciais no processo de N-glicosilação. Enzimas que atuam no início da biossíntese dos N-glicanos encontram-se no compartimento cis e medial, enquanto, enzimas que atuam nas etapas finais encontram-se nos compartimentos trans do complexo de Golgi. Mutações deletérias nos genes que codificam estas enzimas afetam a via da N-glicosilação e identificam alguns subtipos de CDG II, como indicado nos exemplos abaixo^{2,24,64}.

- MGAT2-CDG (CDG-IIa)

O CDG IIa é causado por mutação no gene *MGAT2*, que codifica a enzima N-acetilglicosaminiltransferase-II (GlcNacT-II), presente no complexo de Golgi, que catalisa a conversão do N-glicano oligomanosídico a complexo, através da adição da segunda molécula de N-acetilglicosamina à estrutura do N-glicano.

Portadores de CDG IIa apresentam retardo psicomotor, epilepsia, anormalidades esqueléticas, distúrbios gastrointestinais, atraso de crescimento, atrofia cortical, atraso de mielinização, dismorfismo craniofacial, estereotípias de mãos e grave retardo mental^{36,37}.

- MOGS-CDG (CDG-IIb)

É devido à mutação no gene *MOGS*, que leva à deficiência da enzima alfa1,2 glicosidase, responsável por retirar a primeira molécula de glicose do oligossacarídeo ligado à proteína, primeiro passo do processamento do N-glicano. As características clínicas relatadas em uma criança afetada foram achados dismórficos, hepatomegalia, fibrose hepática e hipotonia generalizada ^{36,47}.

- B4GALT1-CDG (CDG-IIId)

Nos pacientes portadores de CDG-IIId, a estrutura dos N-glicanos das glicoproteínas plasmáticas não apresenta as moléculas de galactose e ácido siálico, como resultado da deficiência da atividade da enzima beta1,4 galactosiltransferase, codificada pelo gene *B4GALT1*. As manifestações clínicas relatadas são deficiência mental, hipotonia, hidrocefalia devido à malformação de Dandy-Walker, distúrbios de coagulação e miopatia ^{36,39}.

- MAN1B1-CDG

Devido à mutação no gene *MAN1B1*, que codifica a enzima alfa 1,2 manosidase, responsável pela clivagem da molécula de manose terminal na posição intermediária do N-glicano. Pacientes com esta mutação apresentam aumento das estruturas de N-glicanos ricas em manose. As características clínicas encontradas são distribuição anormal de gordura, estrabismo, hipotonia, atraso do desenvolvimento motor e da fala ^{16,36}.

1.2.1.2.2 Disfunção do Complexo de Golgi e de Transportadores

Para que o processo de N-glicosilação no complexo de Golgi aconteça de forma completa, é necessária a função de vários componentes, alguns envolvidos na integridade da organela, e outros que participam do processo de N-glicosilação, como por exemplo, os transportadores de monossacarídeos ativados no citosol e núcleo. Mutações deletérias nos genes que codificam qualquer um destes componentes podem afetar diversas vias de glicosilação e múltiplas etapas da N-glicosilação, classificando os subtipos de CDG II como nos exemplos abaixo ^{2,5}:

- SLC35C1-CDG (CDG-IIc)

Nos pacientes com CDG-IIc (também conhecidos como portadores de deficiência de adesão leucocitária tipo II), a deficiência é no transportador de fucose. As estruturas de N-glicanos (moléculas de adesão celular, sialil-Lewis x) presentes em IgM e em proteínas de membrana dos leucócitos são deficientes em fucose. Esta deficiência aumenta o número de leucócitos circulantes e dificulta a migração dos mesmos através dos vasos, levando a frequentes infecções. As estruturas dos N-glicanos não apresentam hiposialização, gerando um padrão normal de glicosilação da transferrina à IEF. Pacientes com este distúrbio apresentaram grave retardo de desenvolvimento, microcefalia, hipotonia, dismorfismo craniofacial e atraso de crescimento, além de achados típicos como infecções recorrentes e leucocitose marcante, durante e entre as infecções ^{36,19,65}.

- SLC35A1-CDG (CDG-IIf)

Este CDG é causado por deficiência no transportador de ácido siálico ativado, presente na membrana do complexo de Golgi. Devido à deficiência de ácido siálico, os leucócitos não apresentam sialil-Lewis x (moléculas de adesão). Os portadores deste distúrbio apresentam neutropenia grave, trombocitopenia, formação de plaquetas gigantes, presença de glicoproteínas anormais nas plaquetas, ataxia e não apresentam outros sinais neurológicos ^{36,48}.

- SLC35A2-CDG (CDG-IIm)

A combinação de resultados de análise bioquímica com dados de sequenciamento de nova geração levou à descoberta de um defeito no transportador de galactose ligado ao cromossomo X. Este defeito foi encontrado

na forma de mosaïcismo em dois outros pacientes. A identificação de mosaïcismo em pacientes com CDG representa uma explicação para a variabilidade fenotípica encontrada nestes pacientes. As características clínicas relatadas foram atraso de desenvolvimento, hipotonia, anomalias esqueléticas e malformação cerebral ^{2,36}.

- COG7-CDG (CDG-Ile)

O complexo COG (oligomérico Golgi conservado), composto por 8 subunidades de proteínas, é crítico para a estrutura e função do complexo de Golgi, além de influenciar o tráfego de componentes dentro do mesmo. Portadores de CDG-Ile possuem mutação no gene *COG7*, que afeta várias etapas do processo de glicosilação, por impedir o tráfego normal de múltiplas glicosiltransferases e transportadores de monossacarídeos ativados. Esta mutação afeta tanto a síntese de N-glicanos quanto de O-glicanos. As manifestações clínicas descritas nos pacientes portadores de CDG-Ile foram asfixia perinatal, dismorfismos incluindo orelhas displásicas, micrognatia, pescoço curto, encefalopatia, doença hepática e aumento de enzimas lisossômicas no plasma ^{26,36,64}.

- ATP6V0A2-CDG

Mutações neste gene causam deficiência da enzima adenosina trifosfatase (ATPase), relacionada à membrana de vesículas celulares e associada a um gradiente anormal de prótons nestas vesículas. Isto leva à maturação anormal das glicosiltransferases secretadas e tráfego anormal de glicoproteínas. As características clínicas incluem cutis laxa e pele enrugada ^{31,36}.

- TMEM165-CDG (CDG-IIk)

Ainda não está claro o exato mecanismo alterado neste subtipo de CDG II, mas sabe-se que há alteração no gradiente de pH do complexo de Golgi, que leva a defeito de tráfego generalizado, bioquimicamente similar ao observado no ATP6V0A2-CDG. Os pacientes apresentam atraso de crescimento e desenvolvimento, microcefalia, displasia esquelética com ossos mais longos e envolvimento vertebral, braquidactilia, escoliose, baixa estatura, pele enrugada e distribuição anormal de gordura. Os achados laboratoriais incluem elevação da concentração sérica de enzimas hepáticas e creatina quinase (CK) e redução da síntese de fatores de coagulação ^{2,36}.

A identificação de novos genes tem demonstrado a importância da glicosilação na interação célula-célula, sinalização, sobrevivência celular, no desenvolvimento de órgãos, mosaicismos além de consequências de uma glicosilação anormal na função muscular.

1.3 DIAGNÓSTICO DE DISTÚRBIOS CONGÊNITOS DE GLICOSILAÇÃO

Os CDG são classificados em dois tipos, I e II, baseado no padrão de hipoglicosilação (hiposialização) da transferrina por IEF. O CDG I apresenta hiposialização da transferrina, por esta conter um dos sítios de N-glicosilação desocupado (ou seja, há pelo menos uma estrutura de N-glicano ausente na proteína). Entretanto, a estrutura do N-glicano presente está em sua forma completa (sem alteração), e este padrão representa as deficiências na síntese e transferência do LLO para a proteína nascente no RE. No CDG II, os dois sítios de N-glicosilação da transferrina estão ocupados, mas a estrutura do N-glicano ligado à proteína esta alterada (incompleta). Este padrão representa as deficiências nos passos subsequentes, ou seja, processamento e rearranjo do LLO no RE e complexo de Golgi, após a transferência do mesmo para a proteína nascente ^{1,6}.

1.3.1 Focalização isoeétrica da transferrina (Tf IEF)

O reconhecimento laboratorial do defeito bioquímico básico nos CDG (hipoglicosilação de glicoproteínas) é feito pela técnica de focalização isoeétrica, um exame laboratorial que separa as proteínas de acordo com sua carga. As moléculas de proteínas, sendo anfóteras, podem assumir cargas elétricas positivas, negativas ou neutras, dependendo do pH do meio. Na IEF, as proteínas migram em um gel que apresenta um gradiente contínuo de pH, assumindo posições neste gel de acordo com seu ponto de carga elétrica neutra, isto é, seu ponto isoeétrico.

A transferrina é a glicoproteína plasmática de escolha para o estudo da N-glicosilação, por ser abundante e por ter somente dois sítios de glicosilação, formando poucas isoformas. Sua estrutura é composta por uma cadeia polipeptídica simples, com peso molecular de 79.570 daltons, contendo 679

resíduos de aminoácidos. Possui dois lados homólogos, cada um com um sítio de ligação do ferro e somente um dos lados contém os dois sítios de N-glicosilação, onde ocorre a ligação covalente do glicano ao átomo de nitrogênio de um aminoácido específico (asparagina nas posições 413 e 611). A estrutura do glicano ligada à molécula de transferrina apresenta heterogeneidade estrutural, podendo ser mono-, bi-, tri- ou tetra-antênaria. A molécula final da transferrina apresenta teoricamente nove isoformas, definidas segundo o número de resíduos de ácido siálico presentes nas extremidades das antenas, podendo variar de 0 a 8 (Figura 4) ^{49,50}.

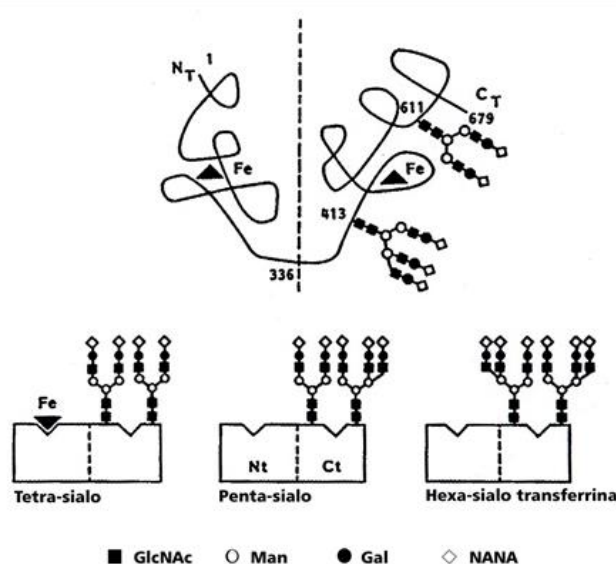


Fig. 4 - Estrutura da transferrina mostrando dois sítios de ligação de ferro, um de cada lado homólogo da molécula, e os dois sítios de glicosilação nas posições asparagina 413 e 611. A imagem inferior mostra algumas isoformas da transferrina (tetra-, penta- e hexassialica) ⁵⁰.

O padrão de glicosilação da transferrina à IEF em indivíduos saudáveis, apresenta usualmente uma intensa banda correspondendo à transferrina tetra-sialica, e duas bandas mais fracas uma acima e outra abaixo desta, correspondendo, respectivamente, às isoformas penta-sialica e tri-sialica (figura 5).

Os CDG I são caracterizados pela diminuição dos resíduos de ácido siálico ligados ao N-glicano da transferrina. Assim o padrão de glicosilação da transferrina à IEF apresenta diminuição da intensidade da banda que representa a transferrina tetra-sialica (transferrina com quatro resíduos de ácido siálico), e aumento das bandas que representam a transferrina di-sialica (ausência de uma

estrutura de N-glicano) e assialotransferrina (ausência de duas estruturas de N-glicanos), como apresentado na figura 5.

Os CDG II apresentam N-glicanos com estruturas antenares incompletas, hipossializadas, ligadas aos dois sítios de N-glicosilação da transferrina. O padrão de glicosilação da transferrina à IEF caracteriza-se pelo aumento da intensidade da banda que representa a transferrina tri-sialica (uma das estruturas antenares incompleta) e/ou das demais bandas que representam isoformas hipossializadas da transferrina, pois o defeito genético ocorre nas etapas em que há o processamento da estrutura antenar do N-glicano (figura 5).

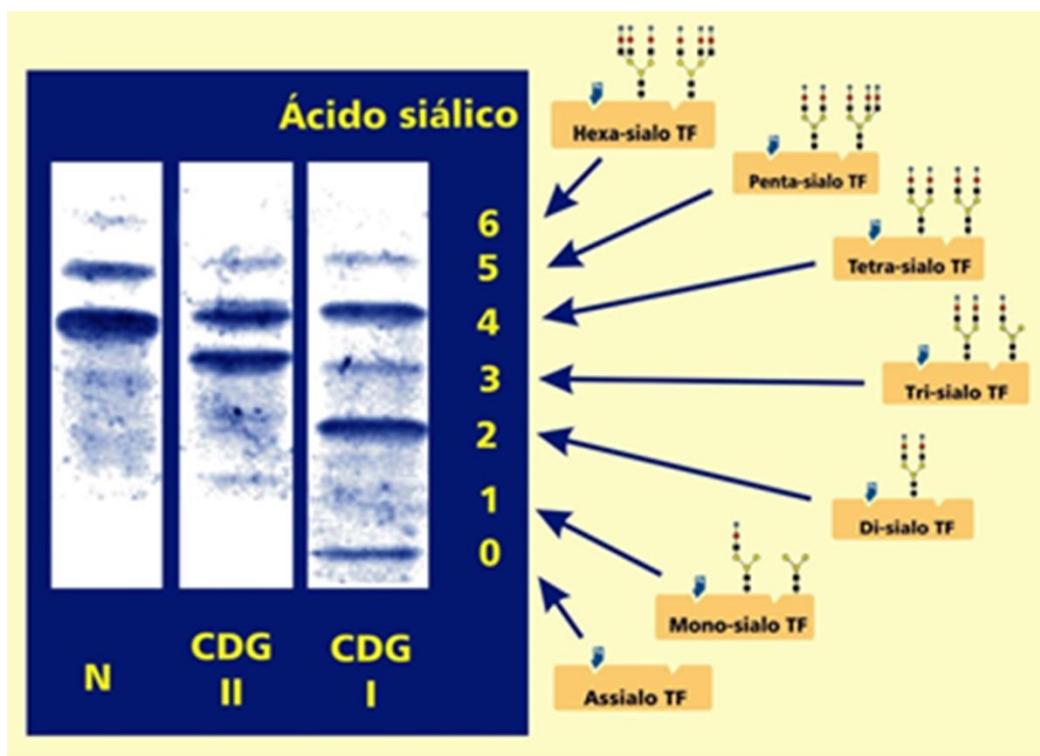


Fig. 5 - Focalização isoeletrica da transferrina sérica mostrando padrões de bandas normais e com diferentes graus de sialização¹⁰.

O padrão de glicosilação da transferrina característico de CDG II pode estar relacionado a CDG, ao polimorfismo da transferrina ou ser secundário a outras doenças (por exemplo, hepatopatias e alcoolismo). Para excluir o polimorfismo, procede-se ao tratamento da amostra com a enzima neuraminidase, que irá eliminar os resíduos de ácido siálico, e repete-se a IEF da transferrina. Quando há polimorfismo, evidenciam-se no ponto de aplicação da amostra duas bandas

referentes às variantes normal e mutada da molécula de transferrina, que migram conforme a alteração da carga elétrica. Nos outros casos, a IEF da transferrina vai apresentar uma única banda referente à presença de apenas uma estrutura da proteína ^{1,10,63}.

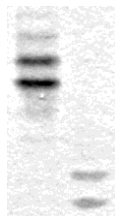


Fig. 6 - Focalização isoelétrica da transferrina sérica mostrando padrões de bandas referentes às variantes normal e mutada da proteína presentes em polimorfismos (à direita IEF da transferrina pós tratamento da amostra com a enzima neuraminidase). Fonte: autor.

Como a técnica IEF depende da alteração da carga elétrica da transferrina pela perda de ácido siálico (negativamente carregado), nem todos os subtipos de CDG são detectados por esta técnica, como, por exemplo, os CDG em que há defeitos na fucosilação ou manosilação (moléculas neutras que não alteram a carga da transferrina) ¹⁷.

A análise das isoformas da transferrina pela técnica de IEF é eficiente para definir a localização do defeito genético (se no RE ou no complexo de Golgi), estreitando assim o painel de genes candidatos para o diagnóstico molecular dos CDG.

1.3.2 Espectrometria de massa

A química e metabolismo de carboidratos há muito tempo desperta o interesse dos cientistas que a princípio consideravam a função dos mesmos como fonte energética e estrutural. Nas décadas de 60 e 70, início da revolução da biologia molecular os estudos dos glicanos ficaram muito aquém dos estudos de outras classes de moléculas, em grande parte devido à sua complexidade estrutural e a dificuldade em determinar suas sequências, além do fato de que sua biossíntese não pode ser predita a partir de um modelo como as proteínas. O desenvolvimento de novas metodologias para explorar as estruturas e funções dos glicanos se deu no final dos anos 80, coincidindo com o desenvolvimento de

novas técnicas de ionização na espectrometria de massa no início da década de 1990, desde então avanços analíticos foram obtidos nos estudos estruturais e quantitativos de glicoproteínas em misturas biológicas complexas. As principais técnicas analíticas utilizadas envolvem diferentes tipos de espectrometria de massa e suas combinações com métodos de separação capilar tais como cromatografia líquida em microcoluna e eletroforese capilar.

Com a introdução de tecnologias de espectrometria de massa (MS) como ionização e dessorção por laser assistida por matriz (MALDI) e ionização por eletrospray (ESI) que permitem a ionização e determinação precisa do peso molecular de biomoléculas tais como proteínas, peptídeos, açúcares e lipídios, têm aumentado as aplicações da MS no diagnóstico clínico incluindo técnicas diversificadas e especializadas que vão desde a quantificação de pequenas moléculas em testes de triagem para erros inatos de metabolismo em recém-nascidos, até metodologias analíticas avançadas para investigações estruturais de moléculas em proteômica e glicômica.

As glicoproteínas podem diferir no número de sítios de glicosilação (macroheterogeneidade) e na variedade de estruturas de glicanos ligados (microheterogeneidade). A MS tem explorado tanto a macro- quanto a microheterogeneidade de glicoproteínas através da determinação de massa das glicofomas. Análises de misturas complexas tais como glicanos plasmáticos totais estão sendo utilizadas para diagnóstico e caracterização de CDG.

A análise dos espectros obtidos por MS de amostras de N-glicanos plasmáticos auxilia o diagnóstico de CDG II por diferenciar a relação massa/carga de cada estrutura presente na amostra analisada, permitindo com esta informação inferir os monossacarídeos que compõem as estruturas dos N-glicanos, sugerindo o defeito bioquímico. Na análise em espectrômetro do tipo MALDI-TOF, a amostra é misturada a uma matriz e aplicada em placa de metal específica de MS. Deixa-se a mistura secar à temperatura ambiente para a formação de cristais da matriz contendo a amostra, a ionização da amostra é obtida através da incidência de laser na matriz, que irá transferir a energia adquirida para a amostra ionizando-a. Os íons são acelerados para fora da fonte em direção ao analisador de massas, e são detectados por um sistema que vai gerar sinais identificando-os e gerando seus respectivos espectros (figura 7) ^{1,35}.

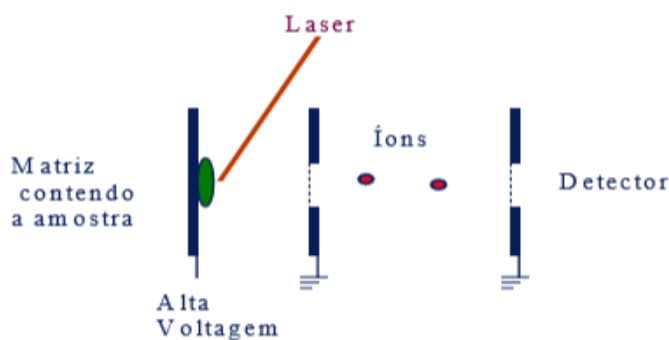


Fig. 7 - Análise em espectrômetro de massa.⁵¹

Já foram descritos espectros específicos para alguns subtipos de CDG II, nas deficiências de glicosiltransferases como no B4GALT1-CDG a análise por MS tipo MALDI dos N-glicanos ligados à transferrina revelou a presença de N-glicanos agalactosilados em maior intensidade que N-glicano complexo bi-antena dissialico^{5,39}. No MGAT2-CDG foi descrito a presença de N-glicanos com apenas uma antena completa em maior intensidade que N-glicano complexo bi-antena dissialico^{5,34} e em MAN1B1-CDG foi relatada a presença de N-glicanos híbridos específicos em um grupo de 12 pacientes¹⁶. Nas deficiências dos transportadores de monossacarídeos a análise por MS revelou ausência das formas fucosiladas no SLC35C1-CDG definindo este diagnóstico, e não apresentou diferença no espectro de SLC35A1-CDG quando comparados ao espectro das amostras controles⁵. Na disfunção do complexo de Golgi como em COG-CDG, ATP6V0A2-CDG e TMEM165-CDG não há características nos espectros que leva a um diagnóstico imediato, entretanto há um aumento de formas hipoglicosiladas com a finalização das antenas com moléculas variadas indicando deficiência em mais de uma glicosiltransferase afetando múltiplas etapas da glicosilação^{5,29}.

No Brasil, a triagem de CDG por Tf IEF é realizada em poucas instituições e nenhuma utiliza MS para o estudo de CDG II. A MS por ser capaz de identificar as diferentes estruturas de N-glicanos na amostra analisada, e revelar diferenças nas abundâncias relativas destas estruturas (figura 8), torna-se importante ferramenta no diagnóstico de CDG II, permitindo inferir a estrutura dos N-glicanos e assim direcionar o diagnóstico molecular específico de CDG II^{5,7,29}.

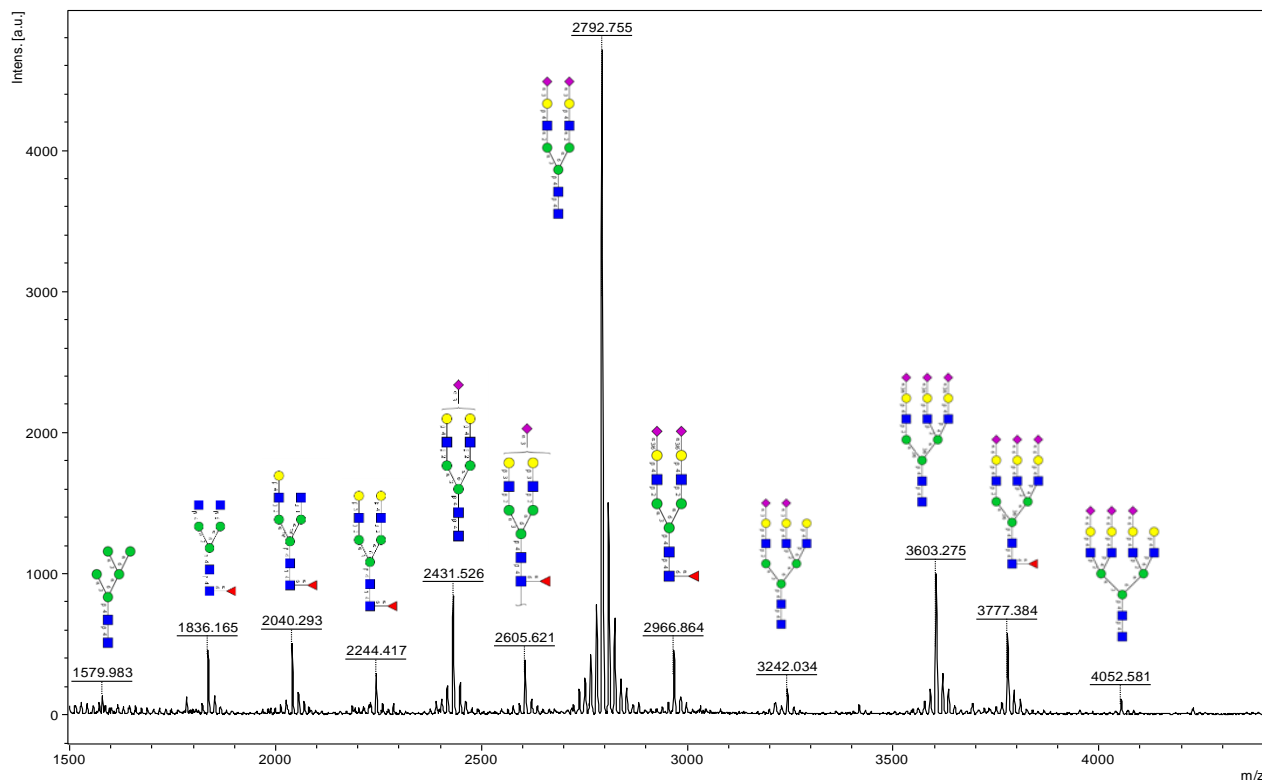


Fig. 8 - Espectro de massas das estruturas de N-glicanos plasmáticos de indivíduo controle. Fonte: autor.

- = N-acetilglicosamina
- = manose
- = galactose
- ◆ = ácido siálico
- ▲ = fucose

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar, através da metodologia de espectrometria de massa, a estrutura e a abundância de N-glicanos plasmáticos de indivíduos com CDG II e controles.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Desenvolver a metodologia de detecção de glicanos por espectrometria de massa.
- 2.2.2 Determinar as estruturas e faixas de variação das abundâncias relativas dos N- glicanos plasmáticos, para estabelecimento de valores de referência dos indivíduos não portadores de CDG II.
- 2.2.3 Descrever as massas das estruturas de N-glicanos plasmáticos e suas abundâncias relativas nos indivíduos portadores de CDG II.
- 2.2.4 Verificar se há estruturas de N-glicanos características, capazes de diagnosticar os subtipos de CDG II, ou se diferenças quantitativas dessas estruturas o fariam.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO

Foi realizado estudo tipo caso-controle.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos neste estudo quinze pacientes na faixa etária de 01 a 13 anos que, por apresentarem quadro clínico e/ou laboratorial compatível com CDG, foram encaminhados ao laboratório de bioquímica genética da Rede Sarah de Hospitais para realização do exame de IEF da transferrina. Nem todos os pacientes apresentaram padrão de glicosilação da transferrina característico de CDG II, mas foram considerados, já que alguns subtipos de CDG II apresentam padrão normal de glicosilação da transferrina. Destes pacientes cinco apresentavam diagnóstico definido por sequenciamento gênico, dois irmãos ATP6V0A2-CDG, duas irmãs PYCR1 e um paciente MAN1B1-CDG.

Como controles foram selecionados vinte e dois pacientes na faixa etária de 01 a 13 anos, que não apresentavam quadro clínico e/ou laboratorial compatível com CDG (para avaliação de geno valgo e geno varo, por exemplo) que foram encaminhados ao laboratório da Rede Sarah de Hospitais para realização de exames não relacionados com estes distúrbios. Foi realizado o exame de IEF da transferrina e todos apresentaram padrão normal de glicosilação da transferrina.

3.3 REAGENTES

Reagentes	Fabricantes
2.5-ácido dihidróxibenzóico (DHB)	Sigma-Aldrich
Acetato de sódio	Sigma-Aldrich
Acetona	Merck (grau cromatográfico)
Acetonitrila	J.T.Baker (grau cromatográfico)
Ácido acético	Dinamica
Carbonato de amônio	Sigma-Aldrich
Cloridrato de guanidina	Sigma-Aldrich
Clorofórmio	J.T.Baker (grau cromatográfico)
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich
Ditiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Enzima PNGase F	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sódio (NaOH)	Sigma-Aldrich
Iodoacetoamida (IAA)	Sigma-Aldrich
Iodometano (ICH ₃)	Sigma-Aldrich
Metanol	Merck (grau cromatográfico)
Tripsina	Sigma-Aldrich

3.4 AMOSTRA BIOLÓGICA

Alíquotas de 1 mL de soro ou plasma foram separadas, congeladas e armazenadas a – 80°C, até sua utilização.

3.4.1 Purificação das Estruturas de N-glicanos para Análise por MS

- Preparo da amostra: Redução, alquilação e deglicosilação das glicoproteínas:

Foi diluído 40 µL da amostra em 200 µL do tampão de redução/alquilação e incubado a 45°C por 90 minutos, 9,6 µL do tampão de redução (preparado na hora do uso) foi acrescentado à amostra que foi incubada a 45°C por 4 horas. Após foi adicionado 9,2 µL do tampão de alquilação (preparado na hora do uso e

acondicionado ao abrigo da luz) e incubado no escuro de 15 a 17 horas. A amostra foi transferida para filtro millipore 10k, adicionado 200 μ L de solução de carbonato de amônio 50 mM e centrifugado 14,000 g por 15 minutos. A amostra foi lavada 4 vezes com 400 μ L solução de carbonato de amônio 50 mM usando o filtro Millipore 10 K (concentrando volume final para 22 μ L), centrifugando a 14,000 g por 15 minutos cada etapa da lavagem. Após transferência da amostra do filtro Millipore 10K para um eppendorf de 2000 μ L de fundo chato (o filtro é colocado de cabeça para baixo dentro do eppendorf e centrifugado 1,000 g por 2 minutos), foi acrescentado 200 μ L da solução de carbonato de amônio 50mM (recém- preparado) à amostra. A tripsina foi dissolvida na solução de carbonato de amônio 50mM (recém preparado) na concentração de 5 μ g/ μ L (preparada na hora do uso), 14 μ L de tripsina foi acrescentada à amostra que foi incubada a 37°C por 24 horas sob agitação de 400 rpm. A amostra foi aquecida em banho-maria a 100 °C por 10 minutos e foi seca no SpeedVac, 200 μ L da solução de carbonato de amônio 50mM (recém-preparado) foi acrescentado à amostra e 3 μ L da enzima PNGase F (diluída em água deionizada) na concentração de 1U/ μ L foi adicionada à amostra que foi incubada em banho-maria a 37 °C por 15 a 17 horas e depois foi seca no SpeedVac .

- Purificação dos N-glicanos:

Foi acrescentado 200 μ L de ácido acético 5% à amostra, uma coluna Sep-Pak C18 foi condicionada com 5 mL de metanol e em seguida com 10 mL de ácido acético 5%.

A amostra foi colocada na coluna Sep-Pak C18 e eluída em tubos de vidro com 3 mL de ácido acético 5% e, em seguida, com ácido acético 5% em 80% de acetonitrila, cada fração foi coletada. N-glicanos foram eluídos em ácido acético 5%, e a fração eluída em ácido acético 5% em 80% de acetonitrila corresponde à mistura de peptídeos e O-glicopeptídeos, a amostra foi seca no SpeedVac.

- Permetilação:

Foi adicionado 500 μ L de DMSO à amostra que estava em tubo de vidro, acrescentado aproximadamente 25 mg de NaOH macerado em cada amostra, as amostras foram colocadas no N-EVAP sob fluxo de nitrogênio e foi adicionado 300

μL de Iodometano deixando a mistura sob fluxo de nitrogênio, as amostras foram retiradas e tampadas rapidamente, misturadas vigorosamente no vórtex e colocadas no banho de ultrassom por 90 minutos em temperatura ambiente e a reação foi parada através da adição de 1 mL de ácido acético 5% em banho de gelo, as amostras foram tampadas e misturadas vigorosamente no vórtex. Foi adicionado 600 μL de clorofórmio, misturadas vigorosamente em vórtex e a mistura foi separada em duas fases a 4°C (banho de gelo), foi transferida com pipeta pasteur de vidro a fase de baixo (clorofórmio) para um novo tubo, repetindo este processo duas vezes (juntando o clorofórmio no mesmo tubo). A fase de clorofórmio foi lavada 8 vezes com o mesmo volume de água deionizada a 4°C (banho de gelo) descartando a fase aquosa (superior), a amostra foi seca no N-EVAP.

- Purificação dos N-glicanos permetilados:

Foi acrescentado 200 μL de metanol à amostra. Uma coluna Sep-Pak C18 foi condicionada com 5 mL de metanol e, em seguida, com 10 mL de água deionizada, a amostra foi colocada na coluna e eluída com 15 mL de água, 2 mL de acetonitrila 10% e 3 mL de acetonitrila a 80%, a fração de acetonitrila 80% foi coletada em 2 eppendorfs de 1500 μL e congelada em nitrogênio líquido ou a -80°C, a amostra foi seca no SpeedVac.

- Preparação da amostra para análise no espectrômetro:

Foi acrescentado 30 μL de acetonitrila à amostra. Foi diluído 10 mg da matriz (ácido 2-dihidroxibenzóico) em 1 mL de acetona e foi misturado v/v com acetato de sódio diluído em metanol na concentração de 1mM. Foi adicionado 2 μL da amostra a 6 μL da matriz, homogeneizado e transferido 1 μL para a placa de espectrômetro, deixou-se a amostra secar a temperatura ambiente e a placa com a amostra seca foi inserida no espectrômetro para análise.

3.4.2 Análise da Amostra no Espectrômetro de Massa

A preparação das amostras de plasma ou soro e análise no espectrômetro de massa foi realizada através de modificações da metodologia já publicada⁷. O equipamento utilizado para análise das estruturas de N-glicanos foi o espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF, modelo Ultraflex III, Modo refletor (Bruker Daltonics, Billerica, MA, US), com análise dos espectros via software FlexAnalysis 3.1 e assinalamento das estruturas dos glicanos com o auxílio do programa GlycoWorkBench (<https://code.google.com/p/glycoworkbench/>). Faixa de aquisição de 1500 a 4500 Daltons (Da).

3.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em pesquisa (CEP) da Rede SARAH de Hospitais de Reabilitação, tendo sido aprovado (anexo B).

Foi assinado o termo de consentimento livre e esclarecido pelos responsáveis legais dos participantes do estudo (apêndices A e B).

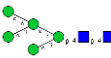
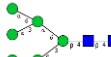
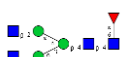
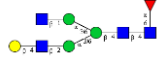
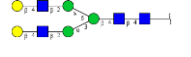
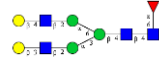
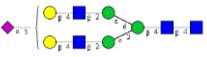

3.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Foi feita análise descritiva e exploratória dos dados quantitativos para comparar grupos, com programa de computador SPSS 8.0.

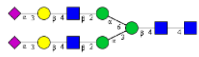
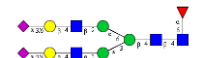



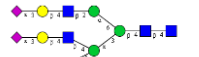


Controles: foram incluídos neste estudo, 17 picos considerados normais ⁷(Quadro 1). Foram calculadas as áreas dos diferentes picos e normalizadas pela área do pico de referência (m/z 2792) e expressas como porcentagem do pico de referência (apêndice C). Pela distribuição não normal dos dados, foi utilizado o teste de Mann-Whitney para verificação de significância das diferenças entre os picos presentes nos controles e pacientes, nível de significância 0,05 (apêndice D). Foram calculados os valores mínimo, máximo, primeiro quartil, terceiro quartil e mediana (apêndice E). Os resultados foram representados em *boxplot* (apêndice F). Cabe notar que nem todos os 17 picos estavam presentes em todas as amostras.

Pacientes: como foi feito com os controles, cada pico teve sua área relativa ao pico referência calculada e expressa em porcentagem (apêndice G), e foram comparados com os controles.

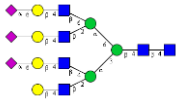
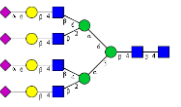
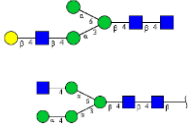
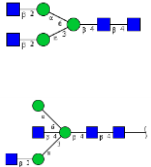
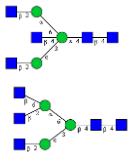
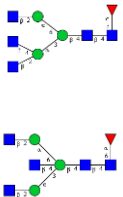
Quadro 1 – Estruturas de N-glicanos, suas massas teóricas e experimentais

Estruturas de N-glicanos	Massa teórica [M+Na] ⁺ em Da	Massa experimental [M+Na] ⁺ em Da (média ± 2DP)
Estruturas Hipoglicosiladas		
 Hex5HexNAc2	1579.78	1579.80 ± 0.05
 Hex6HexNAc2	1783.88	1783.89 ± 0.04
 Hex3HexNAc4dHex1	1835.92	1835.90 ± 0.06
 Hex4HexNAc4dHex1	2040.02	2040.00 ± 0.07
 Hex5HexNAc4	2070.04	2070.00 ± 0.09
 Hex5HexNAc4dHex1	2244.12	2244.09 ± 0.07
 NeuAc1Hex5HexNAc4	2431.21	2431.18 ± 0.08
 NeuAc1Hex5HexNAc4dHex1	2605.30	2605.25 ± 0.08

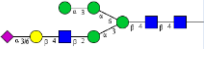
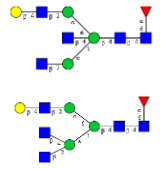
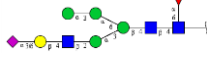
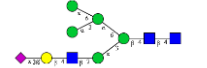

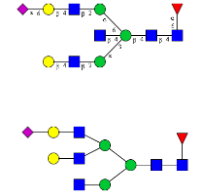
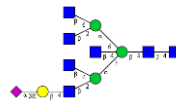
Continuação

Estruturas de N-glicanos	Massa teórica [M+Na] ⁺ em Da	Massa experimental [M+Na] ⁺ em Da (média ± 2DP)
Estruturas de referência		
 <p>NeuAc2Hex5HexNAc4</p>	2792.38	2792.35 ± 0.09
 <p>NeuAc2Hex5HexNAc4dHex1</p>	2966.47	2966.41 ± 0.11
Estruturas Hiperglicosiladas		
 <p>NeuAc2Hex5HexNAc5dHex1</p>	3211.59	3211.52 ± 0.12
 <p>NeuAc2Hex6HexNAc5</p>	3241.61	3241.53 ± 0.12
 <p>NeuAc2Hex6HexNAc5dHex1</p>	3415.70	3415.66 (1) paciente
 <p>NeuAc3Hex6HexNAc5</p>	3602.78	3602.70 ± 0.12
 <p>NeuAc2Hex7HexNAc6</p>	3690.83	3690.70 ± 0,16
 <p>NeuAc3Hex6HexNAc5dHex1</p>	3776.87	3776.76 ± 0.14

Continuação

Estruturas de N-glicanos	Massa teórica [M+Na] ⁺ em Da	Massa experimental [M+Na] ⁺ em Da (média ± 2DP)
Estruturas Hiperglicosiladas		
 <p>NeuAc3Hex7HexNAc6</p>	4052.00	4051.78 ± 0.12
 <p>NeuAc4Hex7HexNAc6</p>	4413.18	4412.91 ± 0.14
Estruturas observadas em CDG II		
 <p>Hex4HexNAc3</p>	1620.81	Não apareceu
 <p>Hex3HexNAc4</p>	1661.83	1661.83 (1) paciente
 <p>Hex3HexNAc5</p>	1906.96	1906.96 ± 0.01
 <p>Hex3HexNAc5dHex1</p>	2081.05	2081.05 ± 0,01

Conclusão

Estruturas de N-glicanos	Massa teórica [M+Na] ⁺ em Da	Massa experimental [M+Na] ⁺ em Da (média ± 2DP)
 <p>NeuAc1Hex5HexNAc3</p>	2186.08	2186.08 ± 0.01
 <p>Hex4HexNAc5dHex</p>	2285.15	2285.15 ± 0.01
 <p>NeuAc1Hex5HexNAc3dHex1</p>	2360.17	2360.17 (2) Pacientes
 <p>NeuAc1Hex6HexNAc3</p>	2390.18	2390.18 (2) Pacientes
 <p>NeuAc1Hex6HexNAc3dHex1</p>	2564.27	2564.25 (2) Pacientes
 <p>NeuAc1Hex5HexNAc5dHex1</p>	2850.42	2850.44 ± 0.04
 <p>NeuAc1Hex4HexNAc7</p>	2962.48	2962.40 ± 0.02

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE QUALITATIVA

Foram analisadas 36 amostras de plasma por espectrometria de massa, destas 22 eram de indivíduos que não apresentavam sinais clínicos e laboratoriais de CDG, e com padrão normal de glicosilação da transferrina à IEF (controles).

Outras quatorze amostras foram de pacientes diagnosticados com CDG II pelo quadro clínico-laboratorial e/ou pelo padrão de glicosilação da transferrina à IEF. Desses quatorze pacientes, quatro apresentavam diagnóstico definido por sequenciamento gênico, dois irmãos ATP6V0A2-CDG, um paciente MAN1B1-CDG e uma paciente com diagnóstico de PYCR1. A paciente 15 com diagnóstico de PYCR1, irmã da paciente 10 que possui o mesmo diagnóstico, foi excluída do estudo pelo fato da análise de sua amostra no espectrômetro de massa não ter apresentado boa qualidade, impossibilitando o aproveitamento dos dados.

O espectro de massa dos N-glicanos plasmáticos das amostras controles revelou a presença de diversas espécies moleculares natriadas, sendo a mais abundante a que corresponde ao N-glicano complexo bi-antena dissialico m/z 2792. Apresentou também outras espécies moleculares natriadas que representam os N-glicanos complexos tri-antena trissialico m/z 3602 e bi-antena monossialico m/z 2431, além de suas respectivas formas fucosiladas m/z 2966, 3776 e 2605. Outras espécies detectadas em menor intensidade foram de formas hipoglicosiladas como o N-glicano oligomanosídico m/z 1579 e N-glicanos complexos incompletos m/z 1835, 2040, 2244 e formas hiperglicosilados tri-antena dissialico m/z 3241, tetra-antena trissialico m/z 4052 (Figura 9).

As amostras dos pacientes apresentaram perfis de N-glicanos das glicoproteínas totais do plasma variados. Um aspecto comum a todos eles foi a maior abundância da espécie molecular natriada correspondente ao N-glicano complexo bi-antena dissialico m/z 2792, o que permitiu descartar dois subtipos de CDG II entre os pacientes estudados, a saber MGAT2-CDG e B4GALT1-CDG^{5,34,39}. As intensidades das formas hipoglicosiladas como os N-glicanos complexos incompletos m/z 1836, 2040 e 2431 estavam bem superior as intensidades destas espécies moleculares natriadas encontradas nas amostras controles. Os espectros

apresentaram também N-glicano complexo tri-antena tri-siálico m/z 3602. Algumas amostras apresentaram espécies de N-glicanos diferenciais, como N-glicano oligomanosídico m/z 1783 e N-glicanos híbridos m/z 2186, 2360, 2390 e 2564, estes últimos sugerindo diagnóstico de um subtipo de CDG II, a saber MAN1B1-CDG ¹⁶ (figuras 10 a 23).

4.2 ANÁLISE QUANTITATIVA

Segundo os resultados obtidos pelo teste de Mann-whitney (apêndice D), os seguintes picos apresentaram abundância significativamente diferente entre os dois grupos (controles e pacientes): 1570, 1783, 1835, 2040, 2244, 2431, 2605, 2966, 3211 e 3241. Algumas amostras de pacientes apresentaram picos diferenciais, que foram portanto, considerados de interesse para estudo. As análises das amostras abaixo foram feitas à partir da avaliação dos resultados observados no apêndice F e nos espectros de massa apresentados.

4.3 PADRÃO DE N-GLICANOS EM INDIVÍDUOS CONTROLE

IEF Transferrina: Padrão normal de glicosilação (intensidade maior da banda que representa a isoforma tetra-siálica, seguida da banda que representa a isoforma penta- e tri-siálica).

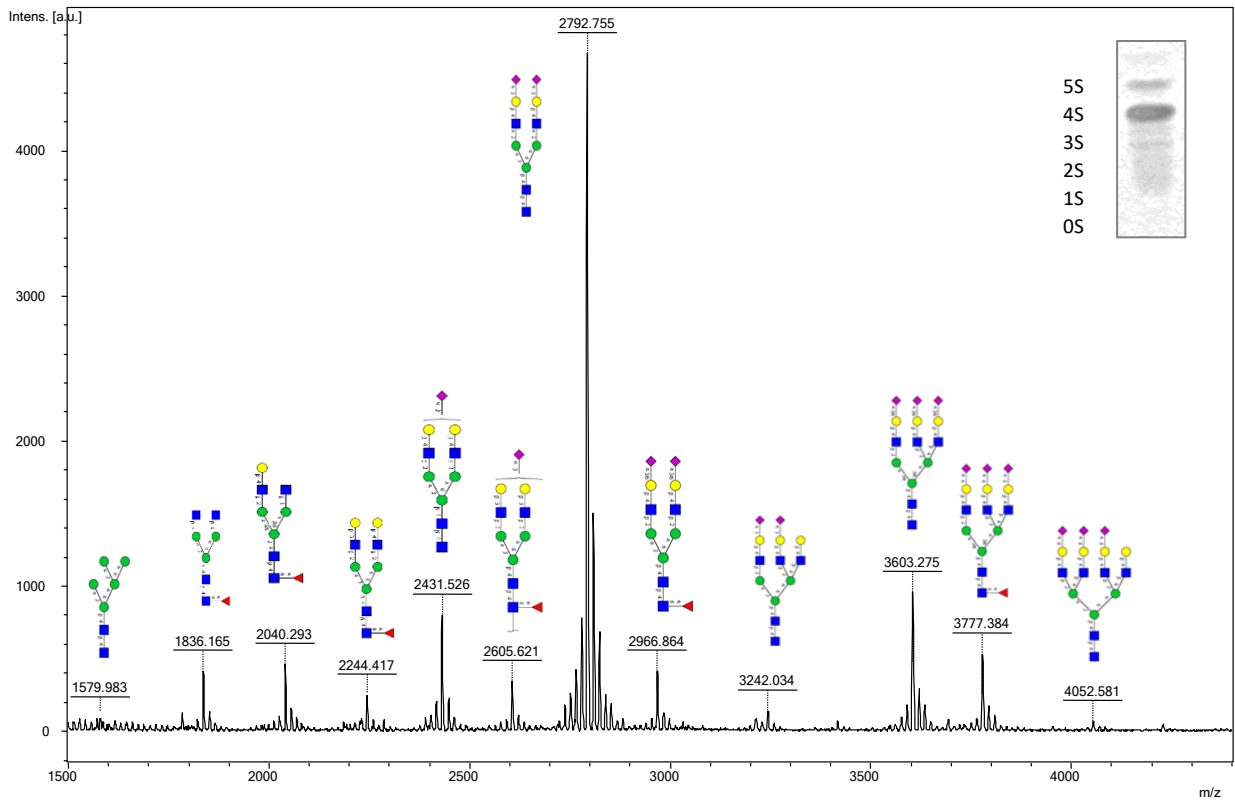


Fig. 09. Espectro de massas das estruturas de N-glicanos plasmáticos representativo das amostras controles, acima à direita do espectro IEF da transferrina.

■ = N-acetilglicosamina; ● = manose; ● = galactose; ◆ = ácido siálico; ◄ = fucose

Na amostra controle, as estruturas mais abundantes correspondem ao N-glicano complexo bi-antena dissialico m/z 2792, seguido dos N-glicanos complexos tri-antena trissialico m/z 3602 e bi-antena monossialico m/z 2431, além de suas respectivas formas fucosiladas m/z 2966; 3776 e 2605. Foram também detectadas outras espécies de N-glicanos complexos, incompletos m/z 1835; 2040; 2244 e hiperglicosilados tri-antena dissialico m/z 3241, tetra-antena trissialico m/z 4052 e em menor quantidade o N-glicano oligomanosídico m/z 1579.

4.4 AMOSTRAS DE PACIENTES

4.4.1 Paciente 1

Diagnóstico: CDG IIx

IEF Transferrina: Padrão de hipoglicosilação CDG II (aumento discreto da intensidade da banda que representa a isoforma tri-siálica).

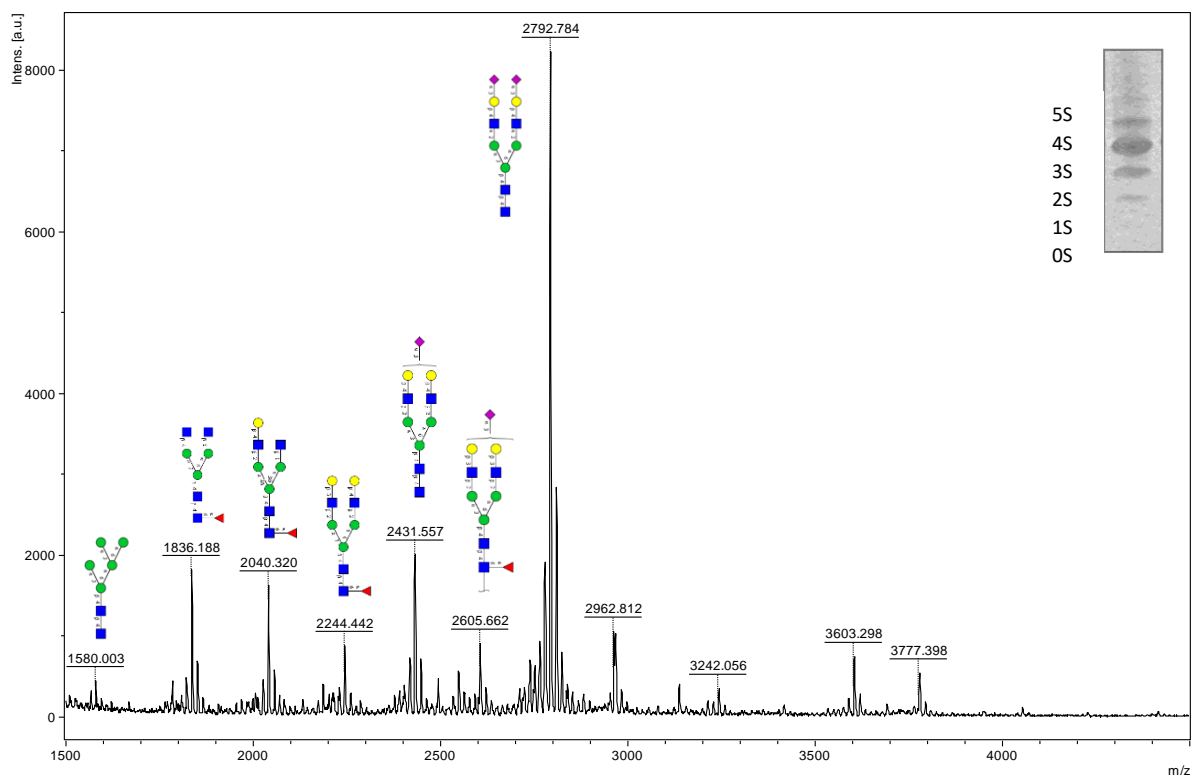


Fig. 10. Espectro de massas das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 1, acima à direita do espectro IEF da transferrina.

Os picos m/z 1579 e 1783 (representam estruturas de N-glicanos ricos em manose) apresentaram-se em quantidade significativamente aumentada, sugerindo defeito nas primeiras etapas do processamento do N-glicano no compartimento cis do complexo de Golgi.

4.4.2 Paciente 2

Diagnóstico: CDG IIx

IEF Transferrina: Padrão de hipoglicosilação CDG II (Diminuição da intensidade da banda que representa a isoforma tetra-siálica e aumento da intensidade das bandas que representam as isoformas tri- e di-siálica).

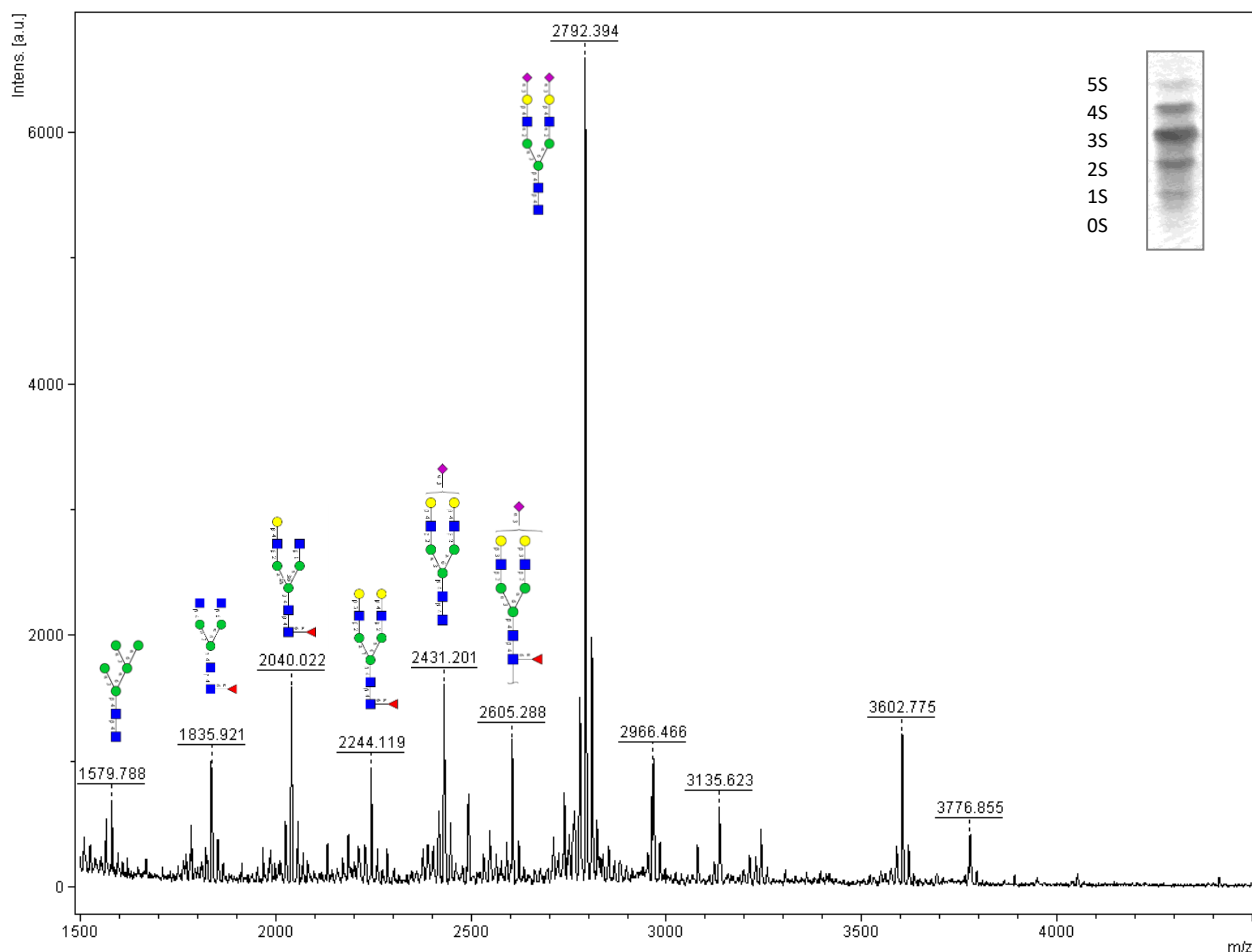


Fig. 11. Espectro de massas das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 2, acima à direita do espectro IEF da transferrina.

Os picos m/z 1579 e 1783 (N-glicanos ricos em manose), 2040 (N-glicano complexo mono-galactosilado fucosilado), 2244 (N-glicano complexo assiálico fucosilado), 2605 (N-glicano complexo mono-siálico fucosilado), 3241 (N-glicano complexo tri-antena di-siálico) apresentaram-se em quantidade significativamente aumentada. Esse padrão é mais complexo do que o visto no paciente 1, por apresentar mais de um tipo de N-glicano e N-glicanos com variadas moléculas terminais das antenas.

4.4.3 Paciente 3 (irmão do paciente 4)

Diagnóstico: ATP6V0A2-CDG

Diagnóstico molecular: p.R63X

IEF Transferrina: Padrão de hipoglicosilação CDG II (aumento da intensidade das bandas que representam as isoformas tri- e di-siálica).

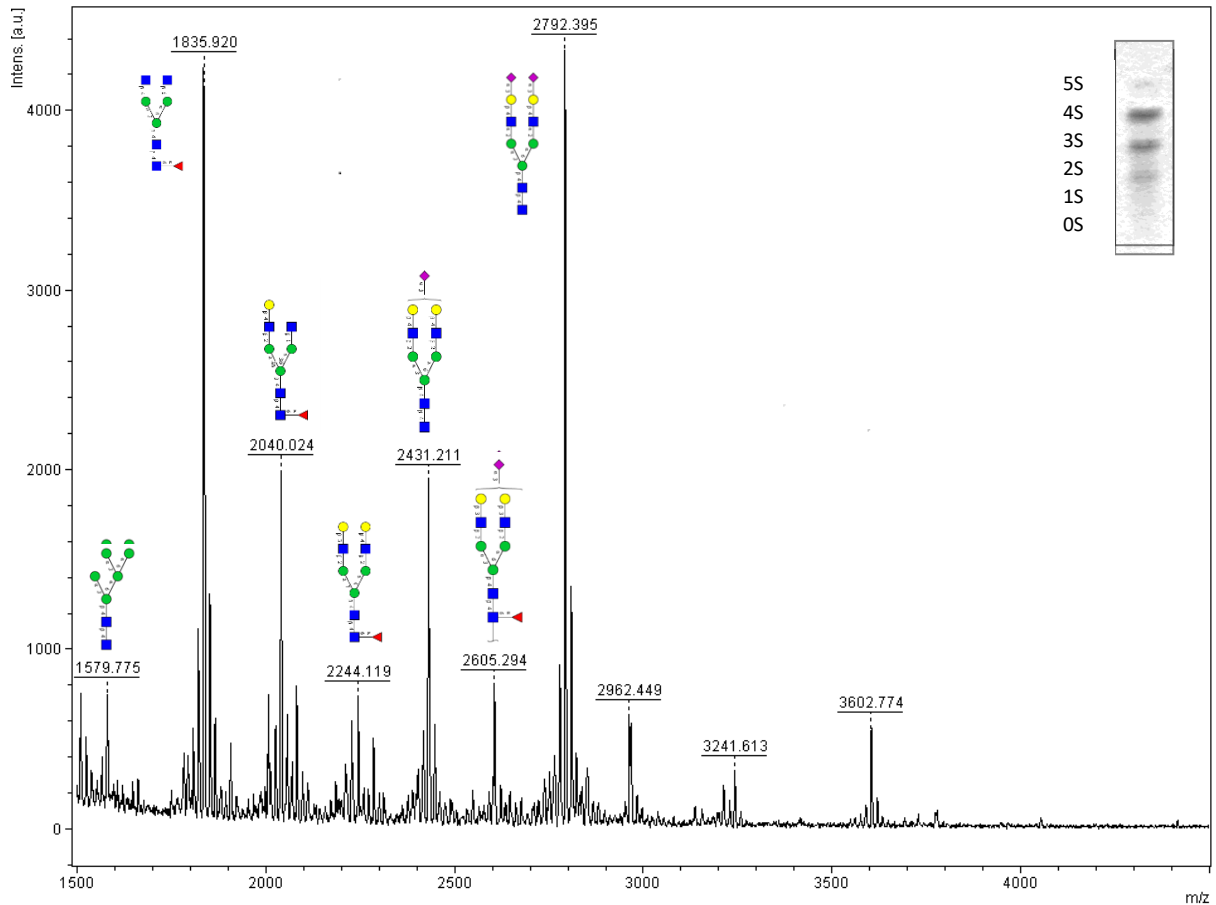


Fig. 12. Espectro de massas das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 3, acima à direita do espectro IEF da transferrina.

Os picos m/z 1579 (N-glicano manosídico), 1835 (N-glicano complexo subgalactosilado fucosilado), 2040 (N-glicano complexo mono-galactosilado fucosilado), 2244 (N-glicano complexo assiálico fucosilado), 2431 (N-glicano complexo mono-siálico), 2605 (N-glicano complexo mono-siálico fucosilado), 3211 (N-glicano complexo di-siálico fucosilado com acréscimo de uma molécula de N-acetilglicosamina), 3241 (N-glicano complexo tri-antena di-siálico) apresentaram-se em quantidade significativamente aumentada.

Esse padrão apresentando mais de um tipo de N-glicano e N-glicanos com variadas moléculas terminais das antenas, é relacionado à deficiência funcional de múltiplas enzimas afetando qualquer etapa dos processos de glicosilações, devido à alteração do gradiente de pH do complexo de Golgi ^{5.29}, este paciente apresenta deficiência da enzima adenosina trifosfatase (ATPase) relacionada com a manutenção do gradiente de pH do complexo de Golgi.

4.4.4 Paciente 4 (irmão do paciente 3)

Diagnóstico: ATP6V0A2-CDG

Diagnóstico molecular: p.R63X

IEF Transferrina: Padrão de hipoglicosilação CDG II (aumento da intensidade das bandas que representam as isoformas tri- e di-siálica).

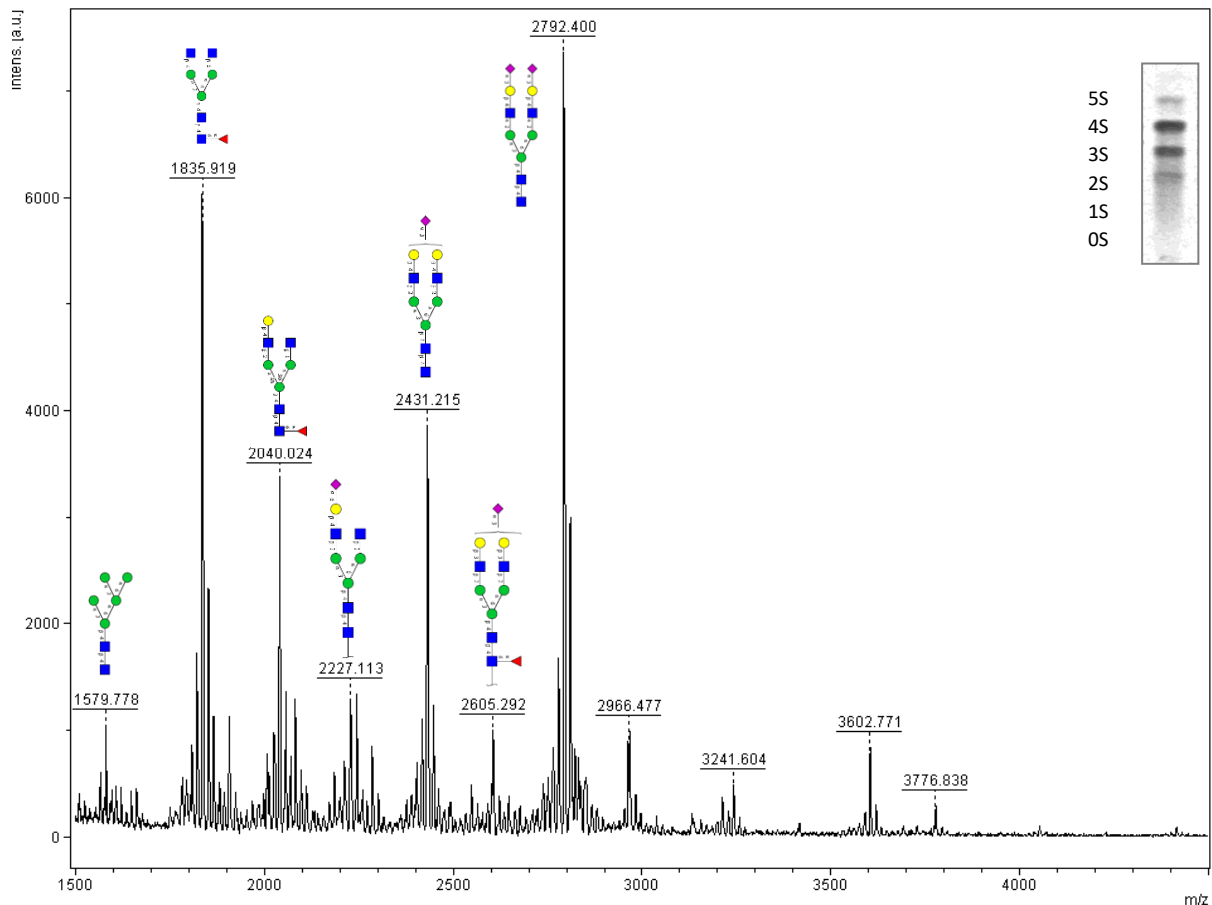


Fig. 13. Espectro de massas das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 4, acima à direita do espectro IEF da transferrina .

Este paciente é irmão do paciente anterior e apresentou um espectro muito similar.

Os picos m/z 1579 (N-glicano manosídico), 1835 (N-glicano complexo subgalactosilado fucosilado), 2040 (N-glicano complexo mono-galactosilado fucosilado), 2244 (N-glicano complexo assiálico fucosilado), 2431 (N-glicano complexo mono-siálico), 3211 (N-glicano complexo di-siálico fucosilado com acréscimo de uma molécula de N-acetilglicosamina), apresentaram-se em

quantidade significativamente aumentada. Este paciente possui o mesmo diagnóstico molecular do irmão.

4.4.5 Paciente 5

Diagnóstico: CDG IIx

IEF Transferrina: Padrão de hipoglicosilação CDG II (discreto aumento da intensidade da banda que representa a isoforma tri-siálica).

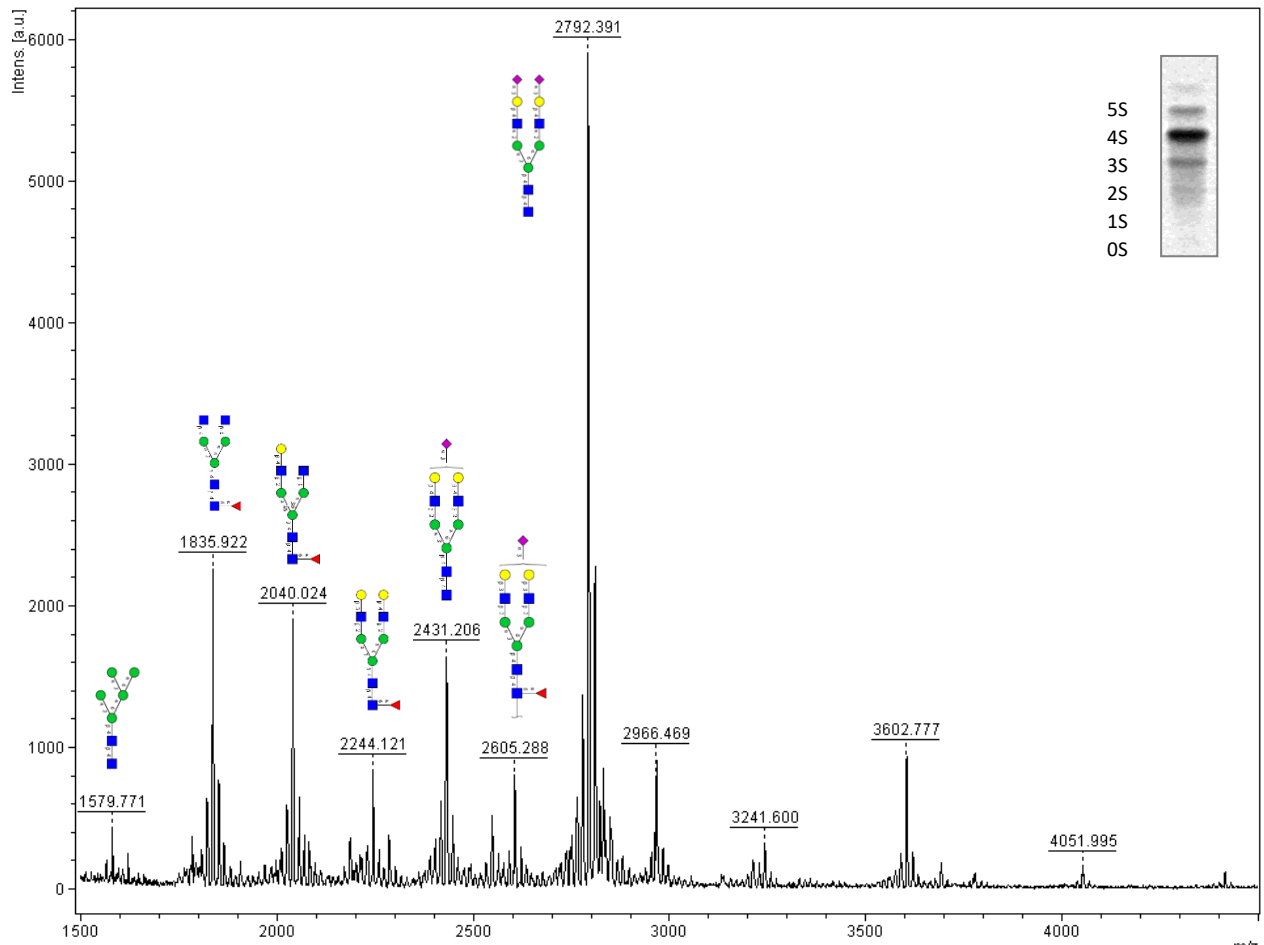


Fig. 14. Espectro de massas das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 5, acima à direita do espectro IEF da transferrina.

Os picos m/z 1579 e 1783 (N-glicanos manosídicos), 1835 (N-glicano complexo subgalactosilado fucosilado), 2040 (N-glicano complexo monogalactosilado fucosilado), 2244 (N-glicano complexo assiálico fucosilado), apresentaram-se em quantidade significativamente aumentada.

Este paciente apresenta ainda aumento dos picos: 2070 (N-glicano complexo assiálico) e 4052 (N-glicano complexo tetra-antena tri-siálico).

4.4.6 Paciente 6

Diagnóstico: CDG IIx

IEF Transferrina: Diminuição da intensidade da banda que representa a isoforma tetra-siálica e aumento discreto da intensidade que representa as bandas tri- e di-siálica.

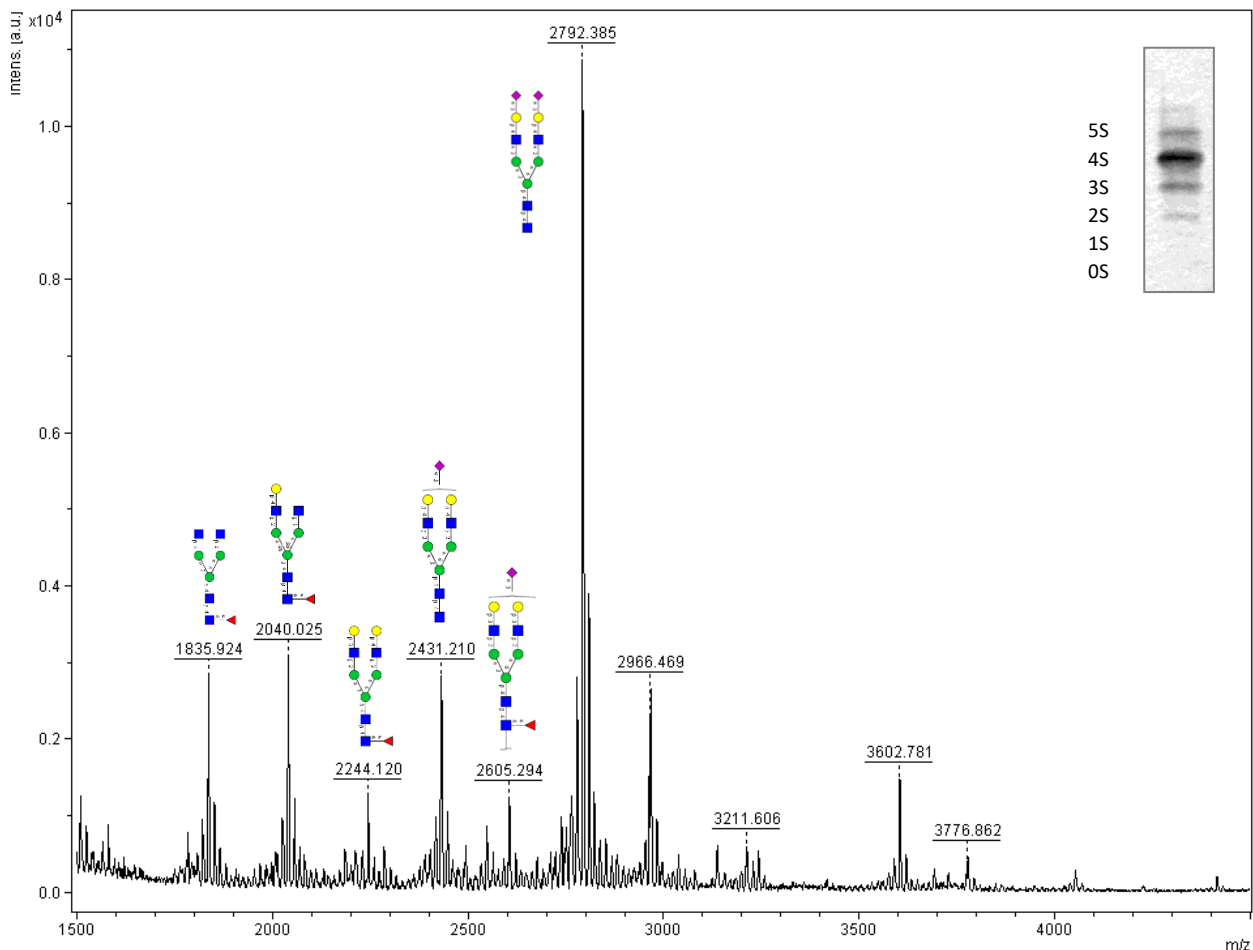


Fig. 15. Espectro de massas das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 6, acima à direita do espectro IEF da transferrina.

Os picos m/z 2040 (N-glicano complexo mono-galactosilado fucosilado), 2966 (N-glicano complexo di-siálico fucosilado) e 3211 (N-glicano complexo di-siálico fucosilado com acréscimo de uma molécula de N-acetilglicosamina), apresentaram-se em quantidade significativamente aumentada.

Neste padrão chama atenção o aumento de formas fucosiladas.

4.4.7 Paciente 7

Diagnóstico: CDG IIx.

IEF Transferrina: Diminuição da intensidade da banda que representa a isoforma tetra-siálica e aumento discreto da intensidade das bandas que representam as isoformas tri- e di-siálica.

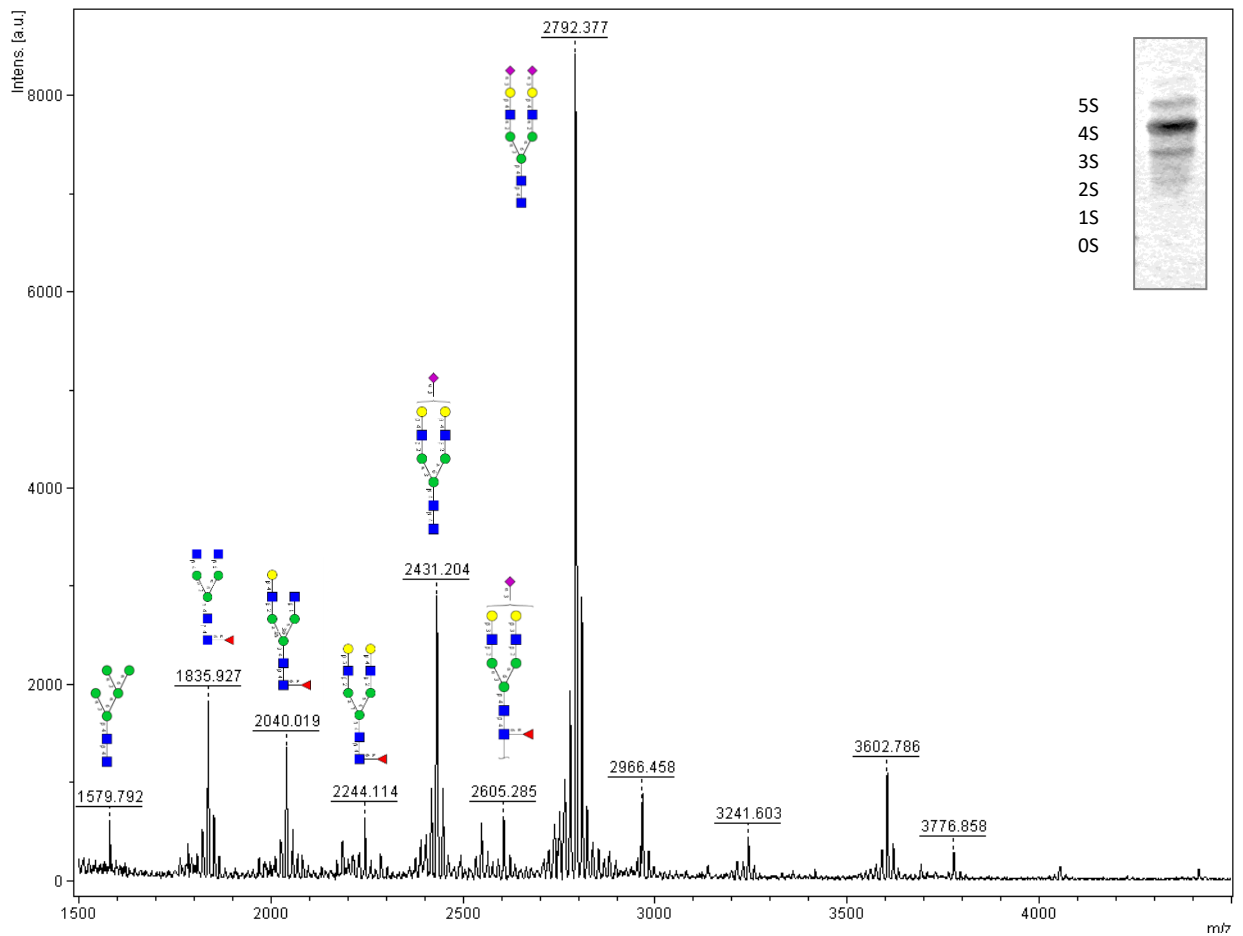


Fig. 16. Espectro de massas das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 7, acima à direita do espectro IEF da transferrina.

Os picos m/z 1579 (N-glicano manosídico) e 2431 (N-glicano complexo mono-siálico) apresentaram-se em quantidade significativamente aumentada.

4.4.8 Paciente 8

Diagnóstico: MAN1B1-CDG

Diagnóstico molecular: p.S409P

IEF Transferrina: Padrão de hipoglicosilação CDG II (aumento da intensidade da banda que representa a isoforma tri-siálica).

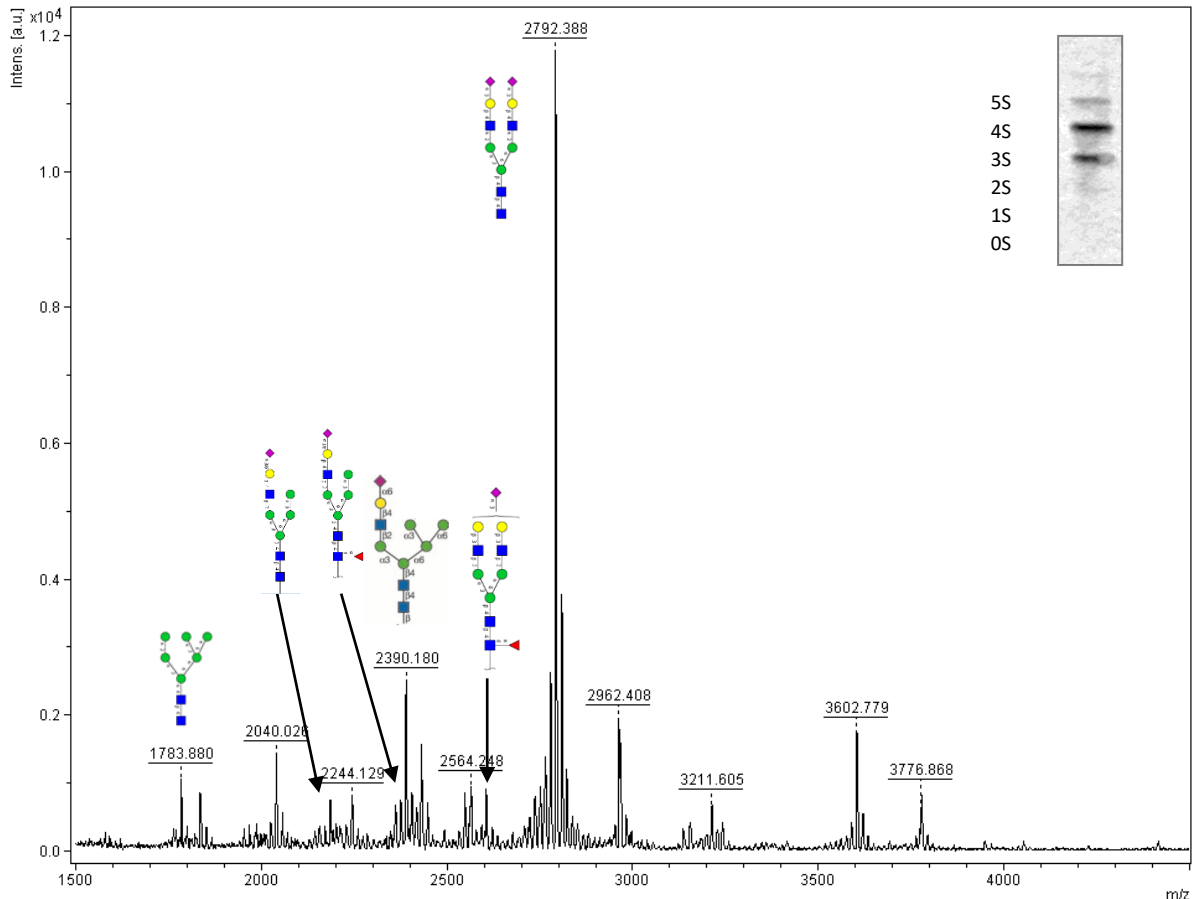


Fig. 17. Espectro de massas das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 8, acima à direita do espectro IEF da transferrina.

Os picos m/z 1579 e 1783 (N-glicanos manosídicos) e 3211 (N-glicano complexo di-siálico fucosilado com acréscimo de uma molécula de N-acetilglicosamina), apresentaram-se em quantidade significativamente aumentada. Este paciente apresentou, também, os picos diferenciais m/z 2186, 2360, 2390 e 2564 (N-glicanos híbridos), coerentes com o diagnóstico definido pelo sequenciamento gênico e, segundo literatura, encontrados em MAN1B1-CDG ¹⁶.

4.4.9 Paciente 9

Diagnóstico: CDG IIx.

IEF Transferrina: Padrão de hipoglicosilação CDG II (aumento da intensidade das bandas que representam as isoformas tri- e di-siálica).

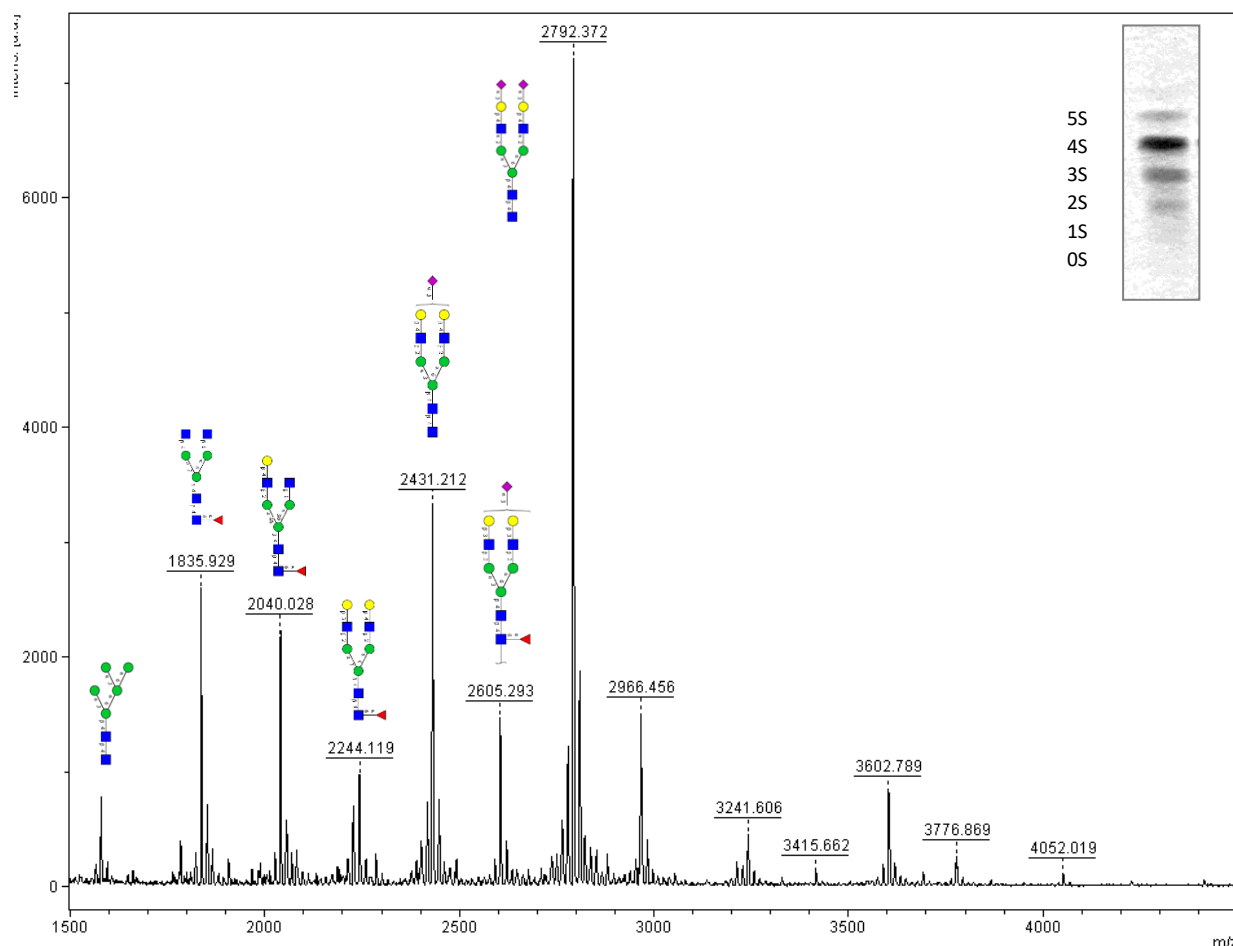


Fig. 18. Espectro de massas das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 9, acima e à direita do espectro IEF da transferrina.

Os picos m/z 1579 (N-glicano manosídico), 1835 (N-glicano complexo subgalactosilado fucosilado), 2040 (N-glicano complexo mono-galactosilado fucosilado), 2431 (N-glicano complexo mono-siálico), 2605 (N-glicano complexo mono-siálico fucosilado), 2966 (N-glicano complexo di-siálico fucosilado) 3211 (N-glicano complexo di-siálico fucosilado com acréscimo de uma molécula de N-acetilglicosamina), 3241 (N-glicano complexo tri-antena di-siálico) apresentaram-se em quantidade significativamente aumentada. Este paciente apresenta ainda aumento do pico m/z 2070 (N-glicano complexo assiálico).

Esse padrão é muito similar ao padrão encontrado nos pacientes 3 e 4, sugestivo de perda da integridade do complexo de Golgi, encontrados em ATP6V0A2-CDG, COG-CDG e em TMEM165-CDG ^{5,29}.

4.4.10 Paciente 10 (irmã da paciente 15, excluída do trabalho)

Diagnóstico: PYCR1

Diagnóstico molecular: mutação *nonsense*

IEF Transferrina: Padrão normal de glicosilação (intensidade maior da banda que representa a isoforma tetra-siálica, seguida das bandas que representam as isoformas penta- e tri-siálica).

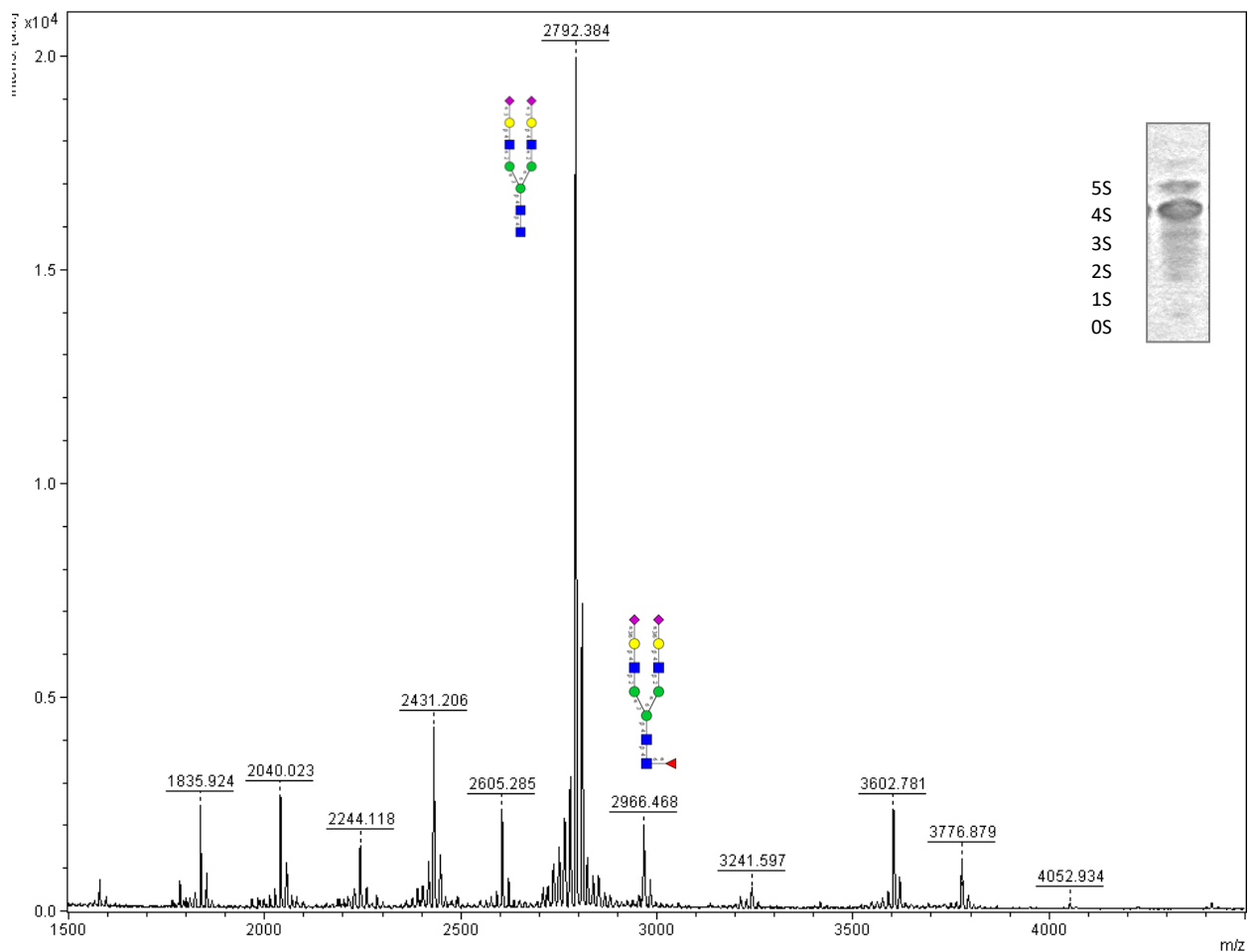


Fig. 19. Espectro de massas das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 10, acima e à direita do espectro IEF da transferrina.

O pico m/z 2966 (N-glicano complexo di-siálico fucosilado), apresentou-se em quantidade significativamente aumentada. Esta paciente apresenta *cutis laxa* autossômica recessiva tipo 2b (ARCL 2b), característica clínica presente em pacientes com CDG II, relacionada à disfunção do complexo de Golgi. Sua irmã, paciente 15 excluída deste estudo, apresenta a mesma característica clínica e apresentou aumento da intensidade de estruturas de N-glicanos hipoglicosiladas no espectro de massa (apêndice H).

4.4.11 Paciente 11

Diagnóstico: CDG IIx.

IEF Transferrina: discreto aumento da intensidade da banda que representa a isoforma tri-siálica.

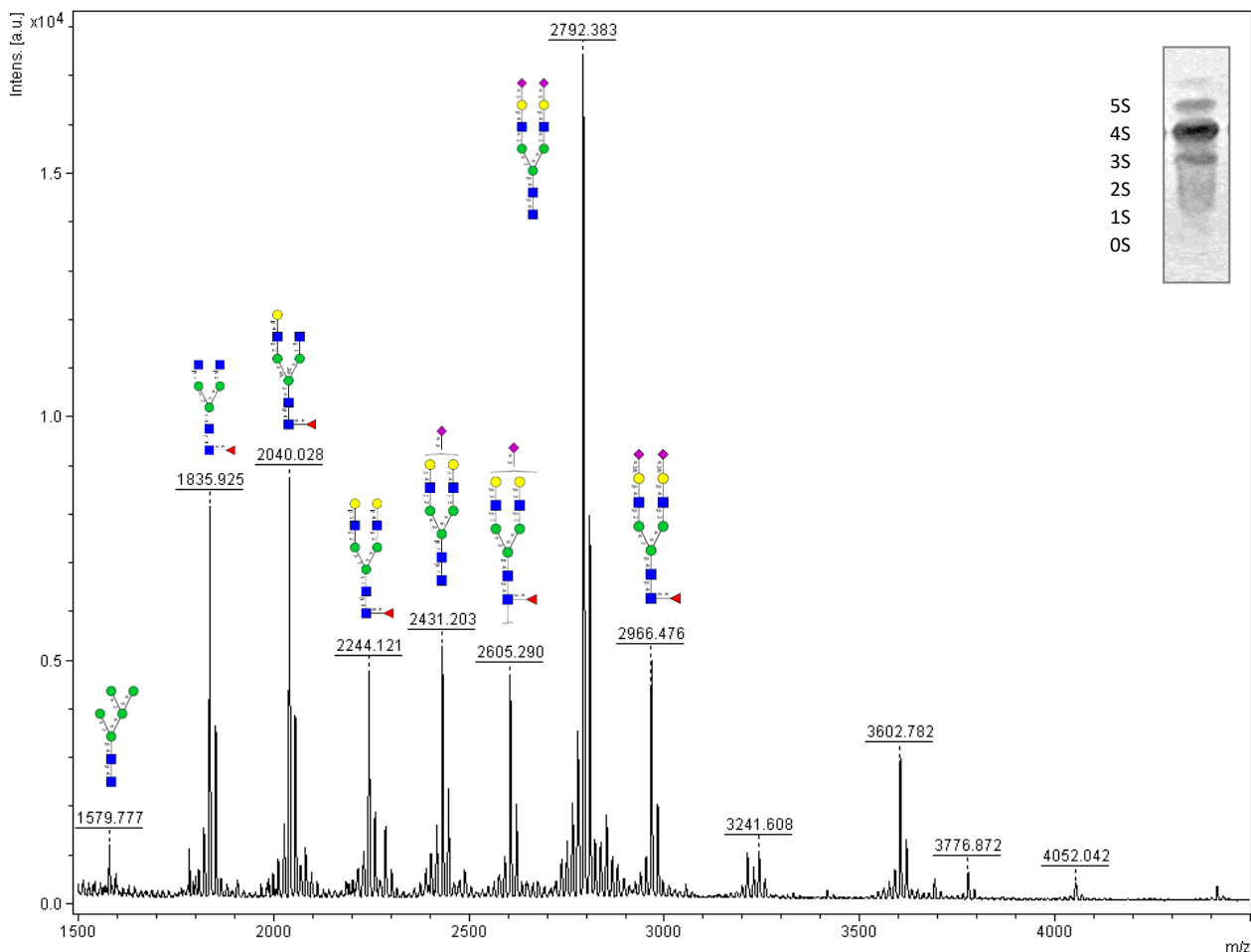


Fig. 20. Espectro de massas das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 11, acima e à direita do espectro IEF da transferrina.

Os picos m/z 1579 e 1783 (N-glicanos manosídicos), 1835 (N-glicano complexo subgalactosilado fucosilado), 2040 (N-glicano complexo mono-galactosilado fucosilado), 2244 (N-glicano complexo assiálico fucosilado), 2605 (N-glicano complexo mono-siálico fucosilado), 2966 (N-glicano complexo di-siálico fucosilado), 3211 (N-glicano complexo di-siálico fucosilado com acréscimo de uma molécula de N-acetilglicosamina), 3241 (N-glicano complexo tri-antena di-siálico) apresentaram-se em quantidade significativamente aumentada. Este paciente apresenta ainda, aumento dos picos m/z 2070 (N-glicano complexo assiálico) e 4052 (N-glicano complexo tetra-antena tri-siálico).

Esse padrão com variadas moléculas terminais das antenas e diferentes tipos de N-glicanos é um padrão mais complexo, sugestivo de interferências em várias etapas da N-glicosilação, encontradas em ATP6V0A2-CDG, COG-CDG e TMEM165-CDG^{5,29}.

4.4.12 Paciente 12

Diagnóstico provável: MAN1B1-CDG.

IEF Transferrina: Padrão de hipoglicosilação CDG II (aumento da intensidade da banda que representa a isoforma tri-siálica).

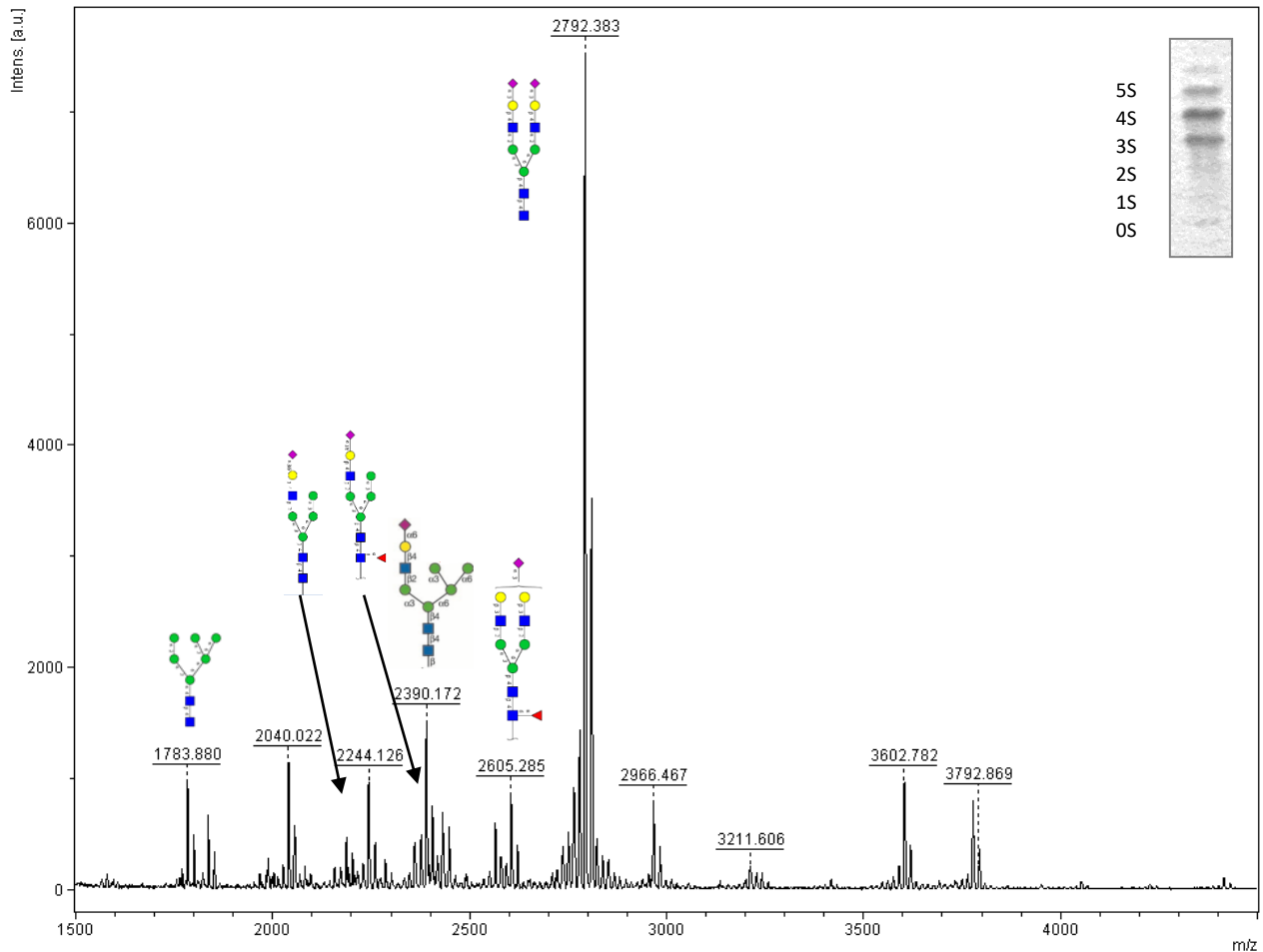


Fig. 21. Espectro de massas das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 12, acima e à direita do espectro IEF da transferrina.

Os picos m/z 1783 (N-glicano manosídico) e 3211 (N-glicano complexo di-siálico fucosilado com acréscimo de uma molécula de N-acetilglicosamina), apresentaram-se em quantidade significativamente aumentada. Este paciente apresentou também, aumento dos picos m/z 3776 (N-glicano complexo tri-siálico fucosilado) e 2186, 2360, 2390, 2564 (N-glicanos híbridos, segundo literatura, encontrados em MAN1B1-CDG)¹⁶.

4.4.13 Paciente 13

Diagnóstico: CDG IIx

IEF Transferrina: Padrão de hipoglicosilação CDG II (aumento da intensidade das bandas que representam as isoformas tri-, di- e mono-siálica).

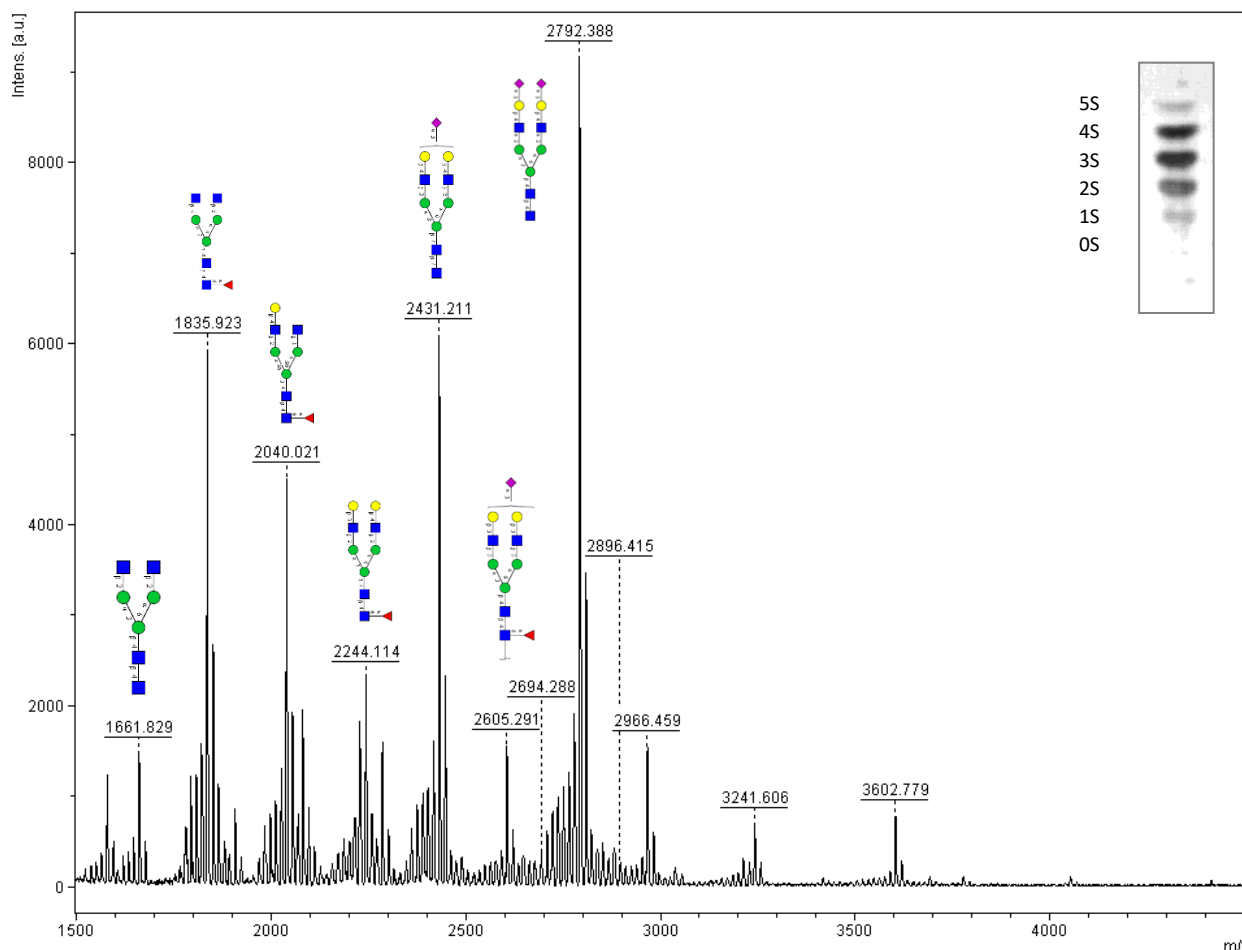


Fig. 22. Espectro de massas das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 13, acima e à direita do espectro IEF da transferrina.

Os picos m/z 1579 (N-glicano manosídico), 1835 (N-glicano complexo subgalactosilado fucosilado), 2040 (N-glicano complexo mono-galactosilado fucosilado), 2244 (N-glicano complexo assiálico fucosilado), 2431 (N-glicano complexo mono-siálico), 2605 (N-glicano complexo mono-siálico fucosilado), 3211 (N-glicano complexo di-siálico fucosilado com acréscimo de uma molécula de N-acetilglicosamina) e 3241 (N-glicano complexo tri-antena di-siálico) apresentaram-se em quantidade significativamente aumentada. Este paciente apresenta ainda aumento do pico m/z 1661 (N-glicano complexo agalactosilado).

Esse padrão é complexo, apresentando aumento de diferentes tipos de N-glicanos e de estruturas com antenas apresentando moléculas terminais variadas, e ainda aumento de alguns picos a ser explorado, sugerindo perda da integridade do complexo de Golgi visto em ATP6V0A2-CDG, COG-CDG e TMEM165-CDG ^{5,29}.

4.4.14 Paciente 14

Diagnóstico: CDG IIx.

IEF Transferrina: Padrão normal de glicosilação. Apresenta polimorfismo da transferrina (intensidade maior das bandas que representam as isoformas tetra- e tri-siálica.

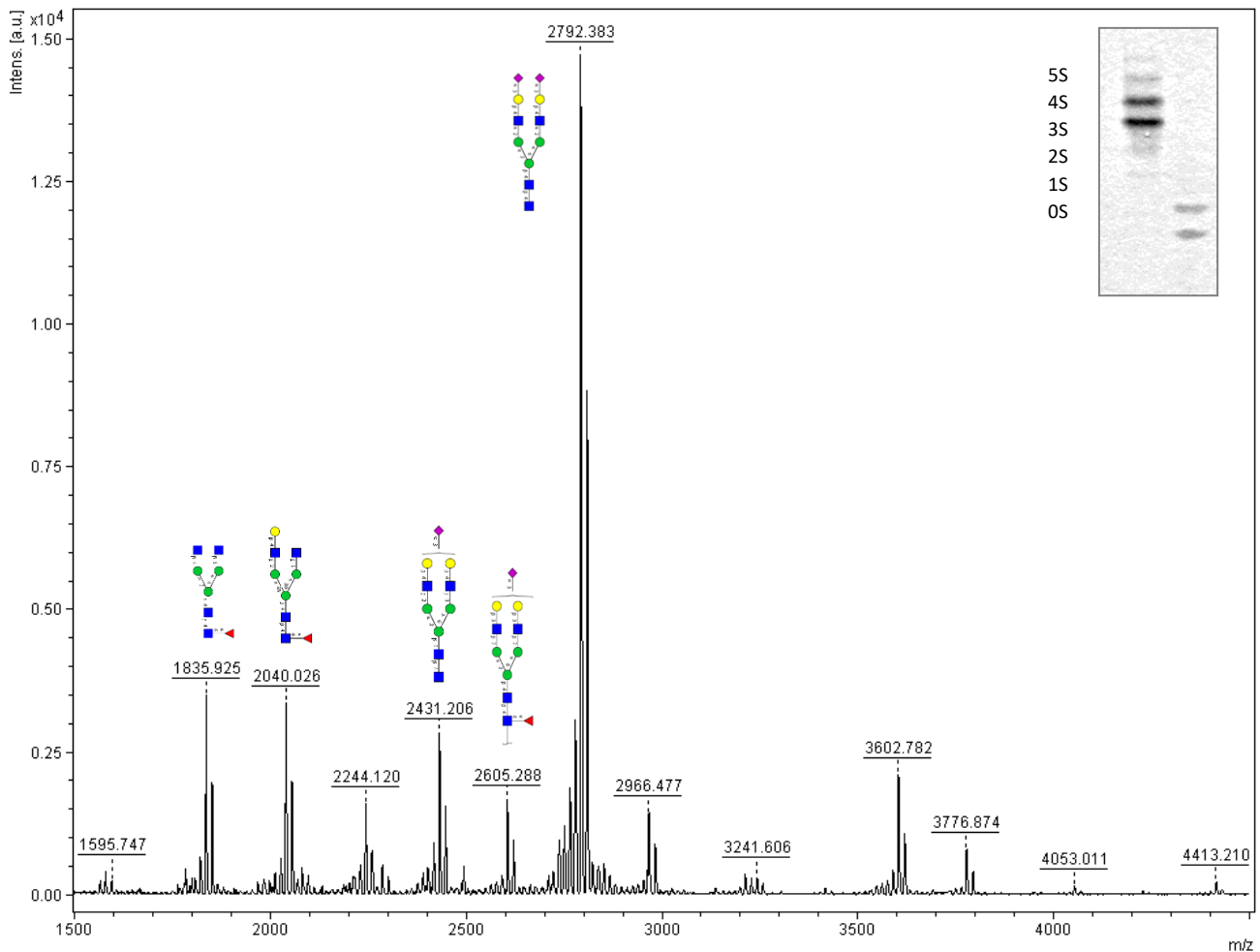


Fig. 23. Espectro de massas das estruturas de N-glicanos plasmáticos do paciente 14. A imagem da IEF da transferrina mostra à direita IEF da amostra após digestão com a enzima neuraminidase. A existência de duas bandas referentes à forma assiálica comprova a presença de polimorfismo da molécula da transferrina.

O pico m/z 3211 (N-glicano complexo di-siálico fucosilado com acréscimo de uma molécula de N-acetilglicosamina) apresentou-se em quantidade significativamente aumentada. Este paciente apresenta ainda, aumento do pico m/z 2070 (N-glicano complexo assiálico). Ele foi incluído neste estudo por apresentar sinais clínicos e laboratoriais sem etiologia esclarecida presentes em pacientes com CDG II.

5 DISCUSSÃO

Devido à inespecificidade dos quadros clínicos dos CDG, que dificulta enormemente seu reconhecimento clínico, é necessário o desenvolvimento de testes diagnósticos. Isso é especialmente importante, uma vez que trata-se de doenças graves, e pela necessidade de se entender melhor a fisiopatogenia, possibilitando o desenvolvimento de tratamentos específicos, como já ocorre em alguns CDG, como PMI-CDG.

A focalização isoelétrica da transferrina reconhece isoformas que se diferem eletricamente entre si, devido unicamente à quantidade de moléculas de ácido siálico terminal nas estruturas de N-glicanos. Embora seja considerado o teste de triagem por excelência para este grupo de patologias, ele não é capaz de detectar todas as formas de CDG, já que algumas formas são caracterizadas por possuírem carboidratos que são eletricamente neutros na posição terminal da estrutura incompleta do N-glicano. Nesses casos, há a necessidade de utilização de outros testes diagnósticos.

Um avanço no estudo das estruturas dos glicanos ocorreu com o uso da espectrometria de massa. Esta metodologia é capaz de diferir as massas, permitindo a identificação dos diferentes monossacarídeos que compõem as estruturas de glicanos. Há diversos tipos de espectrômetros de massa, cada um com suas características analíticas próprias.

Neste trabalho, investigamos os N-glicanos totais no soro ou plasma de indivíduos controles e em quatorze pacientes com sinais clínicos e/ou laboratoriais de CDG. Para tanto, consideramos os tipos de N-glicanos, intensidade das espécies moleculares encontradas, presença de moléculas de ácido siálico e de fucose, além da identidade da molécula terminal da antena.

Em todos os indivíduos estudados houve predominância de N-glicanos complexos bi-antênario dissialico (NeuAc2Hex5HexNAc4, m/z 2792), o que permitiu descartar a possibilidade da presença de dois subtipos de CDG II, MGAT2-CDG e B4GALT1-CDG^{5,34,39}. Nas amostras controles duas outras espécies predominaram: os N-glicanos complexos tri-antênario trissialico

(NeuAc3Hex6HexNAc5, m/z 3603) e bi-antênario monossíalico (NeuAc1Hex5HexNAc4, m/z 2431). Já nos pacientes portadores de CDG II, foi evidenciado acúmulo de uma ou mais espécies de N-glicanos complexos apresentando antenas incompletas e/ou a presença de outros tipos de N-glicanos (oligomanosídico ou híbrido) com m/z entre 1579 e 2605. Não houve um padrão único de picos, o que sugere que nesses pacientes, há dificuldades variadas para o processamento do N-glicano.

O padrão de glicosilação da transferrina à IEF característico de CDG II é explicado pelo aumento das espécies moleculares apresentando apenas uma antena completa com ácido siálico terminal. Alguns subtipos de CDG II apresentam padrão normal de glicosilação da transferrina à IEF, que pode ser explicado entre outros motivos, pelo aumento de espécies moleculares incompletas que não apresentam a molécula de ácido siálico terminal ou por mutações em genes que afetam etapas do processamento do N-glicano que envolvem moléculas neutras, como a fucose. Deste modo, a espectrometria de massa fornece informações adicionais à focalização isoelétrica.

Analisaremos, a seguir, os espectros encontrados neste estudo, enfatizando as informações que permitem obter novos dados acerca dos processos metabólicos dos N-glicanos, fornecidas por esta técnica. Quatro dos pacientes analisados possuíam diagnósticos específicos confirmados por sequenciamento gênico, sendo três sugeridos pela MS. Quanto aos outros dez pacientes, são analisadas as contribuições da técnica para o avanço da definição do diagnóstico.

5.1 MAN1B1-CDG

A deficiência da enzima manosil-oligossacaridase 1,2-alfa-manosidase foi identificada recentemente como causadora de MAN1B1-CDG. A deficiência desta enzima impede a remoção de resíduos de manose durante o processamento dos N-glicanos ligados à proteína. A remoção deste resíduo de manose é necessária para o prosseguimento da extensão da antena que se ramifica à partir da ligação alfa 1-6 no resíduo de manose do núcleo comum do N-glicano.

O paciente oito portador da mutação c.1225T>C no gene *MAN1B1*. Este gene codifica a enzima 1,2-alfa-manosidase, responsável pela clivagem da molécula de manose terminal na posição intermediária do N-glicano, transformando Hex9HexNAc2 em Hex8HexNAc2. O espectro de massas deste paciente apresentou acúmulo de estruturas de N-glicanos oligomanosídicos (Hex5HexNAc2, m/z 1579; Hex6HexNAc2; m/z 1783) e híbridos (NeuAc1Hex5HexNAc3, m/z 2186; NeuAc1Hex5HexNAc3dHex1, m/z 2360; NeuAc1Hex6HexNAc3, m/z 2390; NeuAc1Hex6HexNAc3dHex1, m/z 2564), além de N-glicano complexo (NeuAc2Hex5HexNAc5dHex1, m/z 3211). Este perfil sugere defeito de processamento precoce dos N-glicanos e não é encontrado em indivíduos sem CDG II. A presença dos N-glicanos híbridos com uma ou duas moléculas adicionais de manose (m/z 2186 e 2390), está de acordo com o processamento anormal dos N-glicanos ligados à proteína pela diminuição da atividade da enzima 1,2-alfa-manosidase. Este perfil pode ser considerado como diagnóstico de *MAN1B1*-CDG. No presente paciente, ambos os picos estavam significativamente aumentados¹⁶.

Em outro paciente do presente estudo (paciente 12) foi identificado um espectro de massa com formas hipoglicosiladas apresentando as mesmas características do espectro de massa do paciente 8. Ambos pacientes apresentaram acúmulo de estrutura de N-glicano oligomanosídico (Hex6HexNAc2; m/z 1783). O paciente 12 não apresentou, contudo, acúmulo de N-glicano oligomanosídico (Hex5HexNAc2, m/z 1579). Similarmente, ambos apresentaram acúmulo de N-glicanos complexos hiperglicosilados (NeuAc2Hex5HexNAc5dHex1, m/z 3211) e o paciente 12 apresentou também N-glicanos complexos hiperglicosilados (NeuAc3Hex6HexNAc5dHex1, m/z 3776). Pelo resultado encontrado é provável que o paciente 12 seja portador de mutação deletéria no gene *MAN1B1*, pois há casos descritos na literatura de pacientes portadores de mutações neste gene que à análise estrutural dos N-glicanos não apresentavam alteração significativa do N-glicano oligomanosídico (Hex5HexNAc2, m/z 1579) em relação aos controles^{16, 27,28}.

5.2 ATP6V0A2-CDG

O gene *ATP6V0A2* é responsável pela codificação da subunidade A2 de uma proteína transmembrana (bomba de prótons), uma das responsáveis pela manutenção do gradiente de pH existente no Complexo de Golgi ³¹. Mutações neste gene levam à desorganização do gradiente de pH que, por sua vez, causa a diminuição da atividade de várias enzimas necessárias aos processos de glicosilação. Consequentemente, as reações bioquímicas não ocorrem adequadamente, com acúmulo de estruturas incompletas com variadas moléculas terminais.

Os pacientes 3 e 4 são irmãos, portadores de mutação no gene *ATP6V0A2*, gerando um códon de parada de leitura, que leva à síntese de proteína truncada (p.F63X).

Esses pacientes apresentaram perfis de N-glicanos plasmáticos muito similares. Chamou a atenção o grande acúmulo de N-glicano oligomanosídico (Hex5HexNAc2, *m/z* 1579) e de N-glicanos complexos hiposializados (Hex3HexNAc4dHex1, *m/z* 1835; Hex4HexNAc4dHex1, *m/z* 2040 e NeuAc1Hex5HexNAc4, *m/z* 2431). O paciente 4 apresenta, adicionalmente, uma espécie de N-glicano com molécula terminal de N-acetilglicosamina (NeuAc1Hex4HexNAc4, *m/z* 2227).

Estes achados são consistentes com os casos publicados na literatura. O acúmulo de diferentes tipos de N-glicanos e de estruturas antenares com moléculas terminais variadas, como o encontrado em nossos dois pacientes, é consistente com deficiências de múltiplas glicosiltransferases e sugere deficiência em várias etapas no processo de N-glicosilação, característica dos defeitos de tráfego no complexo de Golgi ^{5,29}.

5.3 PYCR1

Neste estudo foi explorado o perfil de N-glicanos de glicoproteínas totais de duas pacientes irmãs (paciente 10 e 15) com diagnóstico de PYCR1, por sequenciamento gênico, e que apresentavam *cútitis laxa*, característica clínica

também presente em ATP6V0A2-CDG e COG7-CDG. Uma das irmãs (paciente 15) não foi incluída neste estudo por problema na quantificação da área dos picos, que impediu sua inclusão na análise estatística. As duas pacientes apresentaram padrão normal de glicosilação da transferrina à IEF. Entretanto, na análise qualitativa por MS foi detectada clara alteração da N-glicosilação, com aumento da intensidade dos picos m/z 1835 e 2040 (estruturas de N-glicanos complexos subgalactosilado) em uma das irmãs (paciente 15, excluída do trabalho, espectro no apêndice H). Sua irmã (paciente 10) apresentou aumento do pico m/z 2966 (estrutura do N-glicano complexo di-siálico fucosilado). Não é claro o significado do aumento dessa estrutura fucosilada.

Mutações no gene *PYCR1* levam à deficiência de uma enzima mitocondrial, que catalisa o processo final de síntese de prolina utilizando NAD e NADP. Esta enzima está envolvida também na resposta celular ao stress oxidativo. Não há ainda uma clara relação entre esta deficiência enzimática e hipoglicosilação. Segundo literatura, pacientes com cútis laxa relacionada à *PYCR1* não apresentam glicosilação anormal da transferrina à IEF, o que foi concordante com os nossos achados^{40,41}. Entretanto, clara alteração da glicosilação foi observada por MS em uma das irmãs com este diagnóstico. Consideramos este achado relevante. Estudos mais aprofundados deverão ser realizados com estas duas pacientes, para esclarecimento desse achado.

5.4 CASOS SEM DIAGNÓSTICO

Os demais pacientes apresentaram em comum aumento da abundância das estruturas incompletas e hipossializadas de N-glicanos, com m/z compreendidas entre 1579 e 2605.

Os pacientes 1 e 2 apresentaram discreto aumento das estruturas de N-glicanos oligomanosídicos m/z 1579 e 1783, sugerindo problemas no compartimento cis do complexo de Golgi. Os pacientes 5, 6 e 7 apresentaram alterações mais discretas das formas hipoglicosiladas, com apenas uma espécie pouco aumentada, ou com várias espécies discretamente aumentadas. Para esses casos não foi possível sugerir hipóteses diagnósticas.

Os pacientes 9, 11 e 13 apresentaram perfis muito similar aos pacientes 3 e 4 (ATP6V0A2-CDG), com acúmulo de diferentes tipos de N-glicanos e de estruturas antenares com moléculas terminais variadas. O paciente 11 apresentou, ainda, aumento de N-glicano oligomanosídico m/z 1783, indicando deficiências no compartimento cis do complexo de Golgi. O paciente 13 apresentou, adicionalmente, aumento das estruturas dos N-glicanos complexos com moléculas de N-acetilglicosamina terminal m/z 1661 (agalactosilado) e m/z 3211 (di-siálico fucosilado com acréscimo de uma molécula de N-acetilglicosamina). Estes achados sugerem disfunção do complexo de Golgi, com deficiência de múltiplas glicosiltransferases que podem ser visto em ATP6V0A2-CDG, TMEM165-CDG e COG-CDG ou deficiência no transportador de galactose causando um aumento de estruturas de N-glicanos com moléculas terminais de N-acetilglicosamina, entretanto, esta paciente apresenta *cutis laxa*, característica clínica presente em pacientes com ATP6V0A2-CDG, direcionando o diagnóstico para esta patologia. Atualmente sabe-se que a maioria dos CDG II são relacionados à disfunção do complexo de Golgi ou no transporte e metabolismo de monossacarídeos. Embora não haja perfil específico, o padrão complexo de hipoglicosilação visto nessas doenças encaminha a suspeita diagnóstica para essas causas ²⁹.

O paciente 14, de onze anos de idade, foi incluído no estudo por apresentar características clínicas (fraqueza muscular com possível distrofia muscular, deficiência cognitiva e um irmão afetado) e laboratoriais (aumento do fator IX, antitrombina III, ALT e AST e diminuição de FSH e LH) sugestivas de CDG. Entretanto, seu espectro de massa apresentou apenas pequeno aumento do N-glicano complexo assiálico (m/z 2070) e N-glicano complexo di-siálico com acréscimo de moléculas de N-acetilglicosamina (m/z 3211), não contribuindo para o esclarecimento do diagnóstico do mesmo.

Este estudo demonstrou que esta metodologia é capaz de fornecer informações adicionais à focalização isoeétrica, permitindo o reconhecimento de pacientes considerados normais por esta última metodologia. Além disso, é capaz de reconhecer padrões considerados específicos, como o visto no MAN1B1-CDG. Mesmo não fornecendo dados mais concretos para o diagnóstico, esta metodologia permite discriminar os pacientes com padrão de

hipoglicosilação e que devam ser submetidos a outras formas mais aprofundadas de estudo. Até o momento, somente poucos subtipos de CDG, como MGAT2-CDG, B4GALT1-CDG e MAN1B1-CDG, são passíveis de serem diagnosticados através da espectrometria de massa.

O advento da espectrometria de massa para a análise das estruturas de N-glicanos das glicoproteínas totais permitiu grandes avanços no reconhecimento de casos novos de CDG II, além de gerar informações que permitem a melhor compreensão de mecanismos metabólicos e de produção de doenças. Contudo, sua capacidade de auxílio, como ocorre em qualquer metodologia, apresenta limitações. Uma delas é a faixa de massa detectada pelos diversos equipamentos. Neste estudo, avaliamos as massas compreendidas entre 1500 e 4500 Da. Recentemente, foram relatadas estruturas de interesse para o reconhecimento de ALG1-CDG, PMM2-CDG e MPI-CDG, com massas menores, de até 1124 Da ⁴³. Similarmente, é possível que, entre os pacientes avaliados no presente trabalho, haja estruturas que apresentem massa molecular fora da faixa avaliada (1500 a 4500) e que, por isso, não tenham sido identificadas. Deste modo, estudos compreendendo massas menores e maiores do que as estudadas neste trabalho deverão ser realizados.

Progressos recentes na investigação de doenças genéticas, como o seqüenciamento de nova geração, têm levado à descoberta de novos genes implicados como causa dos CDG ¹³. Isso leva a novos *insights* sobre mecanismos ou vias metabólicas de glicosilação.

A avaliação conjunta da análise das isoformas da transferrina por IEF e os espectros obtidos por MS gera informações importantes para monitoramento dos distúrbios no processo de glicosilação. Essa análise pode ser utilizada não somente para o diagnóstico, como também para controle de tratamento com dietas específicas ¹. O reconhecimento dos diagnósticos sugeridos por esses dois métodos leva à 1) diminuição do número de genes a serem investigados por métodos moleculares, direcionando o seqüenciamento gênico, com redução dos custos e maior rapidez dos resultados; 2) possibilita o conhecimento de novos genes envolvidos nos processos de glicosilação, trazendo novos conhecimentos sobre estes distúrbios; 3) amplia as

possibilidades de se descobrir novos biomarcadores e novas tecnologias para diagnóstico e tratamento dos CDG, além de ampliar o conhecimento sobre outros distúrbios relacionados à glicosilação de proteínas.

6 CONCLUSÕES

Os dados do presente estudo permitiram concluir que:

- Nos indivíduos estudados, a diferença entre os resultados das amostras controles e pacientes foi em maior parte quantitativa.
- A espectrometria de massa se mostrou um método de grande auxílio no diagnóstico dos CDG II, uma vez que identificou qualitativamente um subtipo de CDG II e sugeriu outros por meio de diferenças quantitativas.
- Para as diferenças quantitativas, a análise das moléculas terminais das antenas dos N-glicanos direciona o diagnóstico, apontando possíveis distúrbios e estreitando o painel de genes candidatos a serem sequenciados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 [Van Scherpenzeel M](#), [Willems E](#), [Lefeber DJ](#). Clinical diagnostics and therapy monitoring in the congenital disorders of glycosylation. [Glycoconj J](#). 2016 Jun;33(3):345-58.
- 2 [Freeze HH](#), [Chong JX](#), [Bamshad MJ](#), [Ng BG](#). Solving Glycosylation Disorders: Fundamental Approaches Reveal Complicated Pathways. [Am J Hum Genet](#). 2014 Feb 6;94(2):161-75.
- 3 Bertozzi CR, Kiessling LL. Chemical glycobiology. [Science](#). 2001 Mar 23;291(5512):2357-64.
- 4 Hennet T. Diseases of glycosylation beyond classical congenital disorders of glycosylation. [Biochim Biophys Acta](#). 2012 Sep;1820(9):1306-17.
- 5 [Guillard M](#), [Morava E](#), [van Delft FL](#), [Hague R](#), [Körner C](#), [Adamowicz M](#), [Wevers RA](#), [Lefeber DJ](#). Plasma N-Glycan Profiling by Mass Spectrometry for Congenital Disorders of Glycosylation Type II. [Clin Chem](#). 2011 Apr;57(4):593-602.
- 6 [Scott K](#), [Gadomski T](#), [Kozicz T](#), [Morava E](#). Congenital disorders of glycosylation: new defects and still counting. [J Inherit Metab Dis](#). 2014 Jul;37(4):609-17.
- 7 [Morelle W](#), [Michalski JC](#). Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. [Nat Protoc](#). 2007;2(7):1585-602.
- 8 Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation. [Ann N Y Acad Sci](#). 2010 Dec;1214:190-8.
- 9 Stanley P, Schachter H, Taniguchi N. N-Glycans. In: Varki A , Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor; 2009. P. 101-114.
- 10 Pinto MTI. Distúrbios congênitos de glicosilação: modificações pós-traducionais na molécula da transferrina em pacientes da Rede Sarah de Hospitais [dissertação]. Brasília: Hospital Sarah centro, 2005.
- 11 Varki A, Lowe JB. Biological Roles of Glycans. In: Varki A , Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor; 2009. P.75-87.

- 12 Hu Y, Mechref Y. Comparing MALDI-MS, RP-LC-MALDI-MS and RP-LC-ESI-MS glycomic profiles of permethylated N-glycans derived from model glycoproteins and human blood serum. [Electrophoresis](#). 2012 Jul;33(12):1768-77.
- 13 Freeze HH. Understanding Human Glycosylation Disorders: Biochemistry Leads the Charge. *J Biol Chem*. 2013; 288(10):6936-45.
- 14 [Eklund EA](#), [Freeze HH](#). The congenital disorders of glycosylation: a multifaceted group of syndromes. [NeuroRx](#). 2006 Apr;3(2):254-63.
- 15 Freeze HH, Schachter H, Kinoshita T. Genetic Disorders of Glycosylation. *Essentials of Glycobiology*. 3rd ed .(45):Appendix Table 45A.
- 16 [Van Scherpenzeel M](#), [Timal S](#), [Rymen D](#), [Hoischen A](#), [Wuhrer M](#), [Hipgrave-Ederveen A](#), [Grunewald S](#), [Peanne R](#), [Saada A](#), [Edvardson S](#), [Grønborg S](#), [Ruijter G](#), [Kattentidt-Mouravieva A](#), [Brum JM](#), [Freckmann ML](#), [Tomkins S](#), [Jalan A](#), [Prochazkova D](#), [Ondruskova N](#), [Hansikova H](#), [Willemsen MA](#), [Hensbergen PJ](#), [Matthijs G](#), [Wevers RA](#), [Veltman JA](#), [Morava E](#), [Lefeber DJ](#). Diagnostic serum glycosylation profile in patients with intellectual disability as a result of MAN1B1 deficiency. [Brain](#). 2014 Apr;137(Pt 4):1030-8
- 17 Cylwik B, Naklicki M, Chrostek L, Gruszewska E. Congenital disorders of glycosylation. Part I. Defects of protein N-glycosylation. [Acta Biochim Pol](#). 2013;60(2):151-61.
- 18 Varki A, Sharon N. Historical Background and Overview. In: Varki A , Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor; 2009. P. 1-22.
- 19 Becker JD, Lowe BJ. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. [Glycobiology](#). 2003 Jul;13(7):41R-53R.
- 20 [Shah N](#), [Kuntz DA](#), [Rose DR](#). Golgi α -mannosidase II cleaves two sugars sequentially in the same catalytic site. [Proc Natl Acad Sci U S A](#). 2008 Jul 15;105(28):9570-5.
- 21 [Freeze HH](#), [Eklund EA](#), [Ng BG](#), [Patterson MC](#). NEUROLOGICAL ASPECTS OF HUMAN GLYCOSYLATION DISORDERS. [Annu Rev Neurosci](#). 2015 Jul 8;38:105-25.
- 22 [Dwek RA](#), [Butters TD](#), [Platt FM](#), [Zitzmann N](#). Targeting glycosylation as a therapeutic approach. [Nat Rev Drug Discov](#). 2002 Jan;1(1):65-75.

- 23 [Foulquier F](#), [Vasile E](#), [Schollen E](#), [Callewaert N](#), [Raemaekers T](#), [Quelhas D](#), [Jaeken J](#), [Mills P](#), [Winchester B](#), [Krieger M](#), [Annaert W](#), [Matthijs G](#). Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1 deficiency reveals a previously uncharacterized congenital disorder of glycosylation type II. [Proc Natl Acad Sci U S A](#). 2006 Mar 7;103(10):3764-9.
- 24 [Bieberich E](#). Synthesis, Processing, and Function of N-glycans in N-glycoproteins. [Adv Neurobiol](#). 2014;9:47-70.
- 25 Goreta SS, Dabelic S, Dumic J. Insights into complexity of congenital disorders of glycosylation. [Biochem Med \(Zagreb\)](#). 2012;22(2):156-70.
- 26 [Sturiale L](#), [Barone R](#), [Garozzo D](#). The impact of mass spectrometry in the diagnosis of congenital disorders of glycosylation. [J Inherit Metab Dis](#). 2011 Aug;34(4):891-9.
- 27 Jaeken J, [Lefeber DJ](#), Matthijs G. Clinical utility gene card for: MAN1B1 defective congenital disorder of glycosylation. [Eur J Hum Genet](#). 2016 Jul;24(7).
- 28 [Rymen D](#), [Peanne R](#), [Millón MB](#), [Race V](#), [Sturiale L](#), [Garozzo D](#), [Mills P](#), [Clayton P](#), [Asteggiano CG](#), [Quelhas D](#), [Cansu A](#), [Martins E](#), [Nassogne MC](#), [Gonçalves-Rocha M](#), [Topaloglu H](#), [Jaeken J](#), [Foulquier F](#), [Matthijs G](#). MAN1B1 deficiency: an unexpected CDG-II. [PLoS Genet](#). 2013;9(12):e1003989.
- 29 Xia B, [Zhang W](#), [Li X](#), [Jiang R](#), [Harper T](#), Liu R, [Cummings RD](#), [He M](#). Serum N-glycan and O-glycan analysis by mass spectrometry for diagnosis of congenital disorders of glycosylation. [Analytical Biochemistry](#) **442** (2013) 178–185.
- 30 [Wolthuis DF](#), [Janssen MC](#), [Cassiman D](#), [Lefeber DJ](#), [Morava E](#). Defining the phenotype and diagnostic considerations in adults with congenital disorders of N-linked glycosylation. [Expert Rev Mol Diagn](#). 2014 Mar;14(2):217-24.
- 31 [Fischer B](#), [Dimopoulou A](#), [Egerer J](#), [Gardeitchik T](#), [Kidd A](#), [Jost D](#), [Kayserili H](#), [Alanay Y](#), [Tantcheva-Poor I](#), [Mangold E](#), [Daumer-Haas C](#), [Phadke S](#), [Peirano RI](#), [Heusel J](#), [Desphande C](#), [Gupta N](#), [Nanda A](#), [Felix E](#), [Berry-Kravis E](#), [Kabra M](#), [Wevers RA](#), [van Maldergem L](#), [Mundlos S](#), [Morava E](#), [Kornak U](#). Further characterization of ATP6V0A2-related autosomal recessive cutis laxa. [Hum Genet](#). 2012 Nov;131(11):1761-73.
- 32 [Bai L](#), [Li Q](#), [Li L](#), [Lin Y](#), [Zhao S](#), [Wang W](#), Wang R, [Li Y](#), [Yuan J](#), [Wang C](#), [Wang Z](#), [Fan J](#), [Liu E](#). Plasma High-Mannose and Complex/Hybrid N-Glycans Are

- Associated with Hypercholesterolemia in Humans and Rabbits. [PLoS One](#). 2016 Mar 21;11(3):e0146982.
- 33 [Le Parc A](#), [Karav S](#), [Bell JM](#), [Frese SA](#), [Liu Y](#), [Mills DA](#), [Block DE](#), [Barile D](#). A novel endo- β -N-acetylglucosaminidase releases specific N-glycans depending on different reaction conditions. [Biotechnol Prog](#). 2015 Sep-Oct;31(5):1323-30.
- 34 Kleinert P, Kuster T, Durka S, Ballhausen D, Bosshard NU, Steinmann B, Hanseler E, Jaeken J, Heizmann CW, Troxler H. Mass spectrometric analysis of human transferrin in different body fluids. [Clin Chem Lab Med](#). 2003 Dec;41(12):1580-8.
- 35 [Kailemia MJ](#), [Ruhaak LR](#), [Lebrilla CB](#), [Amster IJ](#). Oligosaccharide Analysis by Mass Spectrometry: A Review of Recent Developments. [Anal Chem](#). 2014 Jan 7;86(1):196-212.
- 36 Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM[®]. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD).
- 37 [Tan J](#), [Dunn J](#), [Jaeken J](#), [Schachter H](#). Mutations in the MGAT2 gene controlling complex N-glycan synthesis cause carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type II, an autosomal recessive disease with defective brain development. [Am J Hum Genet](#). 1996 Oct;59(4):810-7.
- 38 [Baycin-Hizal D](#), [Gottschalk A](#), [Jacobson E](#), [Mai S](#), [Wolozny D](#), [Zhang H](#), [Krag SS](#), [Betenbaugh MJ](#). Physiologic and pathophysiologic consequences of altered sialylation and glycosylation on ion channel function. [Biochem Biophys Res Commun](#). 2014 Oct 17;453(2):243-53.
- 39 [Hansske B](#), [Thiel C](#), [Lubke T](#), [Hasilik M](#), [Honing S](#), [Peters V](#), [Heidemann PH](#), [Hoffmann GF](#), [Berger EG](#), [von Figura K](#), [Korner C](#). Deficiency Of UDP-galactose:N-acetylglucosamine β -1,4-galactosyltransferase I causes the congenital disorder of glycosylation type II_d. [J Clin Invest](#). 2002 Mar;109(6):725-33.
- 40 [Gardeitchik T](#), [Mohamed M](#), [Fischer B](#), [Lammens M](#), [Lefeber D](#), [Lace B](#), [Parker M](#), [Kim KJ](#), [Lim BC](#), [Haberle J](#), [Garavelli L](#), [Jagadeesh S](#), [Kariminejad A](#), [Guerra D](#), [Leao M](#), [Keski-Filppula R](#), [Brunner H](#), [Nijtmans L](#), [van den Heuvel B](#), [Wevers R](#), [Kornak U](#), [Morava E](#). [Clinical and biochemical features guiding the diagnostics in neurometabolic cutis laxa](#). [Eur J Hum Genet](#). 2014 Jul;22(7):888-95.

- 41 [Mohamed M](#), [Kouwenberg D](#), [Gardeitchik T](#), [Kornak U](#), [Wevers RA](#), [Morava E](#). Metabolic cutis laxa syndromes. [J Inherit Metab Dis](#). 2011 Aug;34(4):907-16.
- 42 [Harada Y](#), [Nakajima K](#), [Masahara-Negishi Y](#), [Freeze HH](#), [Angata T](#), [Taniguchi N](#), [Suzuki T](#). Metabolically programmed quality control system for dolichol-linked oligosaccharides. [Proc Natl Acad Sci U S A](#). 2013 Nov 26;110(48):19366-71.
- 43 [Zhang W](#), [James PM](#), [Ng BG](#), [Li X](#), [Xia B](#), [Rong J](#), [Asif G](#), [Raymond K](#), [Jones MA](#), [Hegde M](#), [Ju T](#), [Cummings RD](#), [Clarkson K](#), [Wood T](#), [Boerkoel CF](#), [Freeze HH](#), [He M](#). A Novel N-Tetrasaccharide in Patients with Congenital Disorders of Glycosylation, Including Asparagine-Linked Glycosylation Protein 1, Phosphomannomutase 2, and Mannose Phosphate Isomerase Deficiencies. [Clin Chem](#). 2016 Jan;62(1):208-17.
- 44 Freeze HH, Schachter H. Genetic Disorders of Glycosylation. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor; 2009. P. 585-600.
- 45 [Morava E](#), [Wopereis S](#), [Coucke P](#), [Gillessen-Kaesbach G](#), [Voit T](#), [Smeitink J](#), [Wevers R](#), [Grünwald S](#). Defective protein glycosylation in patients with cutis laxa syndrome. [Eur J Hum Genet](#). 2005 Apr;13(4):414-21.
- 46 [Haslam SM](#), [Julien S](#), [Burchell JM](#), [Monk CR](#), [Ceroni A](#), [Garden OA](#), [Dell A](#). Characterizing the glycome of the mammalian immune system. [Immunol Cell Biol](#). 2008 Oct;86(7):564-73.
- 47 De Praeter CM, G J Gerwig, E Bause, L K Nuytinck, J F Vliegthart, W Breuer, J P Kamerling, M F Espeel, J J Martin, De Paepe AM, N W Chan, G A Dacremont, Van Coster RNV. A novel disorder caused by defective biosynthesis of N-linked oligosaccharides due to glucosidase I deficiency. [Am J Hum Genet](#). 2000 Jun;66(6):1744-56.
- 48 Song Z. Roles of the nucleotide sugar transporters (SLC35 family) in health and disease. [Mol Aspects Med](#). 2013 Apr-Jun;34(2-3):590-600.
- 49 [De Jong G](#), [van Eijk HG](#). Microheterogeneity of human serum transferrin: a biological phenomenon studied by isoelectric focusing in immobilized pH gradients. [Electrophoresis](#). 1988 Sep;9(9):589-98.

- 50 [De Jong G](#), [Feelders R](#), [Van Noort WL](#), [Van Eijk HG](#). Transferrin microheterogeneity as a probe in normal and disease states. [Glycoconj J](#). 1995 Jun;12(3):219-26.
- 51 Azevedo DA. Espectrometria de massas [apostila]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, laboratório central de biologia molecular estrutural. Disponível em: <http://www.cebimepropesq.ufsc.br>.
- 52 [Edvardson S](#), [Ashikov A](#), [Jalas C](#), [Sturiale L](#), [Shaag A](#), [Fedick A](#), [Treff NR](#), [Garozzo D](#), [Gerardy-Schahn R](#), [Elpeleg O](#). Mutations in SLC35A3 cause autism spectrum disorder, epilepsy and arthrogyrosis. [J Med Genet](#). 2013 Nov;50(11):733-9.
- 53 [Foulquier F](#), [Vasile E](#), [Schollen E](#), [Callewaert N](#), [Raemaekers T](#), [Quelhas D](#), [Jaeken J](#), [Mills P](#), [Winchester B](#), [Krieger M](#), [Annaert W](#), [Matthijs G](#). Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1 deficiency reveals a previously uncharacterized congenital disorder of glycosylation type II. [Proc Natl Acad Sci U S A](#). 2006 Mar 7;103(10):3764-9.
- 54 Lühn K; Wild MK; Eckhardt M; Gerardy-Schahn R; Vestweber D. The gene defective in leukocyte adhesion deficiency II encodes a putative GDP-fucose transporter. [Nat Genet](#). 2001; 28(1):69-72.
- 55 [Kodera H](#), [Ando N](#), [Yuasa I](#), [Wada Y](#), [Tsurusaki Y](#), [Nakashima M](#), [Miyake N](#), [Saitoh S](#), [Matsumoto N](#), [Saito H](#). Mutations in COG2 encoding a subunit of the conserved oligomeric golgi complex cause a congenital disorder of glycosylation. [Clin Genet](#). 2015 May;87(5):455-60.
- 56 [Rymen D](#), [Winter J](#), [Van Hasselt PM](#), [Jaeken J](#), [Kasapkara C](#), [Gokçay G](#), [Haijes H](#), [Goyens P](#), [Tokatli A](#), [Thiel C](#), [Bartsch O](#), [Hecht J](#), [Krawitz P](#), [Prinsen HC](#), [Mildenberger E](#), [Matthijs G](#), [Kornak U](#). Key features and clinical variability of COG6-CDG. [Mol Genet Metab](#). 2015 Nov;116(3):163-70.
- 57 [Reynders E](#), [Foulquier F](#), [Annaert W](#), [Matthijs G](#). How Golgi glycosylation meets and needs trafficking: the case of the COG complex. [Glycobiology](#). 2011 Jul;21(7):853-63.
- 58 [Rosnoblet C](#), [Peanne R](#), [Legrand D](#), [Foulquier F](#). Glycosylation disorders of membrane trafficking. [Glycoconj J](#). 2013 Jan;30(1):23-31.
- 59 [Hennet T](#), [Cabalar J](#). Congenital disorders of glycosylation: a concise chart of glycoalkaloid dysfunction. [Trends Biochem Sci](#). 2015 Jul;40(7):377-84.

- 60 [Cherepanova N](#), [Shrimal S](#), [Gilmore R](#). N-linked glycosylation and homeostasis of the endoplasmic reticulum. [Curr Opin Cell Biol](#). 2016 Aug;41:57-65.
- 61 [Shrimal S](#), [Cherepanova NA](#), [Gilmore R](#). Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum. [Semin Cell Dev Biol](#). 2015 May;41:71-8.
- 62 [Jaeken J](#). Congenital disorders of glycosylation. [Handb Clin Neurol](#). 2013;113:1737-43.
- 63 Albahri Z, Marklová E, Vaníček H, Minxová L, Dédek P, Skálová S. Genetic variants of transferrin in the diagnosis of protein hypoglycosylation. *J Inher Metab Dis*. 2005;28(6):1184-8.
- 64 Reynders E, Foulquier F, Annaert W, Matthijs G. How Golgi glycosylation meets and needs trafficking: the case of the COG complex. [Glycobiology](#). 2011 Jul;21(7):853-63.
- 65 Sturla L, Rampal R, Haltiwanger RS, Fruscione F, Etzioni A, Tonetti M. Differential terminal fucosylation of N-linked glycans versus protein O-fucosylation in leukocyte adhesion deficiency type II (CDG IIc). [J Biol Chem](#). 2003 Jul 18;278(29):26727-33.
- 66 Freeze HH, Aebi M. Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. [Curr Opin Struct Biol](#). 2005 Oct;15(5):490-8.
- 67 Miller BS, Freeze HH. New disorders in carbohydrate metabolism: congenital disorders of glycosylation and their impact on the endocrine system. [Rev Endocr Metab Disord](#). 2003 Mar;4(1):103-13.
- 68 Wells L, Hart GW. Glycomics: building upon proteomics to advance glycosciences. *Mol Cell Proteomics*. 2013 Apr;12(4):833-5.
- 69 [Garrido D](#), [Barile D](#), [Mills DA](#). A molecular basis for bifidobacterial enrichment in the infant gastrointestinal tract. [Adv Nutr](#). 2012 May 1;3(3):415S-21S.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DOS CONTROLES



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

Eu, _____, portador da carteira de identidade n° _____, responsável pelo paciente _____, prontuário _____, autorizo a coleta de sangue do mesmo, para fazer parte de um grupo de indivíduos selecionados como não portadores de distúrbios congênitos de glicosilação (controles), em um estudo que tem como objetivo caracterizar, por espectrometria de massa, estruturas de glicanos presentes em proteínas plasmáticas de indivíduos portadores e não portadores de distúrbios congênitos de glicosilação. Esse estudo, caso apresente bons resultados, irá permitir a implementação desta metodologia no laboratório de bioquímica genética da Rede Sarah/Centro.

Estou ciente de que:

 Será realizado também o exame de focalização isoelétrica da transferrina plasmática, teste usado para identificar a presença de proteínas anormais que são características dos distúrbios congênitos de glicosilação. Este teste será realizado como critério de inclusão dos participantes no estudo, uma vez que ele define prováveis indivíduos portadores de distúrbios congênitos de glicosilação (CDGs).

1. Para a realização desses exames será acrescido o volume de 1(um) ml de sangue total ao volume de sangue que irá ser coletado para os outros exames solicitados pelo médico, esse volume extra coletado não acarreta nenhum desconforto adicional e nenhum prejuízo à saúde do paciente, não será utilizado para outra finalidade, e será descartado ao final do estudo.
2. Após o final do estudo, caso a metodologia apresente bom desempenho, os resultados dos exames realizados poderão ser disponibilizados aos participantes ou aos seus responsáveis, através de solicitação por escrito.
3. Os resultados dos exames laboratoriais realizados poderão ser utilizados para trabalhos científicos, publicados em revista médica (impressa ou em sítios médicos da internet), ou apresentados em congresso médico ou palestras para médicos. Estas atividades serão executadas mantendo-se a confidencialidade da identidade dos participantes do estudo.

4. É garantido ao paciente ou a seus representantes legais, a liberdade de retirar este consentimento a qualquer momento, sem qualquer prejuízo à continuidade do tratamento na Instituição.
5. Esta autorização não implica em nenhum tratamento diferenciado no atendimento na Rede Sarah, assim como a recusa em assiná-lo não acarretará nenhum prejuízo ao paciente.
6. É permitido o acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para o esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a farmacêutica-bioquímica Nilza do Carmo Fontes que pode ser encontrada nos telefones: (61) 3319-1369 3319-1307.

Pode-se contatar também o CEP (Comitê de Ética em Pesquisa):

Associação das Pioneiras Sociais

SMHS quadra 301, Edifício Pioneiras Sociais, Bloco B, entrada A, 3º andar, Brasília, DF .

CEP: 70335-901

Telefone: (61)3319-1494

E-mail: comiteeticapesquisa@sarah.br

7. Após estes esclarecimentos e ciente de que a participação na pesquisa é voluntária, dato e assino este termo, também assinado pela pesquisadora em duas cópias, uma que ficará sob meus cuidados e a outra arquivada com a pesquisadora.

Brasília, de de 2015.

Assinatura do responsável legal pelo paciente

Nilza do Carmo Fontes - Telefones: (61) 3319-1369 3319-1307

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DOS PACIENTES



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

Eu, _____, portador da carteira de identidade
nº _____, responsável pelo paciente _____, prontuário
_____, autorizo a coleta de sangue do mesmo, para fazer parte de um

grupo de indivíduos selecionados como portadores de distúrbios congênitos de glicosilação (CDGs), em um estudo que tem como objetivo caracterizar, por espectrometria de massa, estruturas de glicanos presentes em proteínas plasmáticas de indivíduos portadores e não portadores de distúrbios congênitos de glicosilação. Esse estudo, caso apresente bons resultados, irá permitir a implementação desta metodologia no laboratório de bioquímica genética da Rede Sarah/Centro.

Estou ciente de que:

Será realizado também o exame de focalização isoelétrica da transferrina plasmática, teste usado para identificar a presença de proteínas anormais que são características dos distúrbios congênitos de glicosilação. Este teste será realizado como critério de inclusão dos participantes no estudo, uma vez que ele define prováveis indivíduos portadores de CDGs.

1. Para a realização desses exames será acrescido o volume de 1(um) ml de sangue total ao volume de sangue que irá ser coletado para os outros exames solicitados pelo médico, esse volume extra coletado não acarreta nenhum desconforto adicional e nenhum prejuízo à saúde do paciente, não será utilizado para outra finalidade, e será descartado ao final do estudo.
2. Após o final do estudo, caso a metodologia apresente bom desempenho, os resultados dos exames realizados poderão ser disponibilizados aos participantes ou aos seus responsáveis, através de solicitação por escrito.
3. Os resultados dos exames laboratoriais realizados poderão ser utilizados para trabalhos científicos, publicados em revista médica (impresa ou em sítios médicos da internet), ou apresentados em congresso médico ou palestras para médicos. Estas atividades serão executadas mantendo-se a confidencialidade da identidade dos participantes do estudo.

4. Fotografias clínicas do paciente poderão ser utilizadas neste trabalho, em publicações científicas ou congressos médicos.
5. É garantido ao paciente ou a seus representantes legais, a liberdade de retirar este consentimento a qualquer momento, sem qualquer prejuízo à continuidade do tratamento na Instituição.
6. Esta autorização não implica em nenhum tratamento diferenciado no atendimento na Rede Sarah, assim como a recusa em assiná-lo não acarretará nenhum prejuízo ao paciente.
7. É permitido o acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para o esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a farmacêutica-bioquímica Nilza do Carmo Fontes que pode ser encontrada nos telefones: (61) 3319-1369 3319-1307. Pode-se contatar também o CEP (Comitê de Ética em Pesquisa):

Associação das Pioneiras Sociais
SMHS quadra 301, Edifício Pioneiras Sociais, Bloco B, entrada A, 3º andar, Brasília, DF .
CEP: 70335-901
Telefone: (61)3319-1494
E-mail: comiteeticapesquisa@sarah.br

8. Após estes esclarecimentos e ciente de que a participação na pesquisa é voluntária, dato e assino este termo, também assinado pela pesquisadora em duas cópias, uma que ficará sob meus cuidados e a outra arquivada com a pesquisadora.

Brasília, de de 2015.

Assinatura do responsável legal pelo paciente

Nilza do Carmo Fontes - - Telefones: (61) 3319-1369 3319-1307

APÊNDICE C – PORCENTAGENS DAS ÁREAS DOS PICOS PRESENTES NOS CONTROLES, NORMALIZADOS PELA ÁREA DO PICO REFERÊNCIA *m/z* 2792

Controles	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
<i>m/z</i>	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%		
1579						2,21								0,91		2,27		1,33	1,26	0,84				
1783											1,74			1,27		2,41		1,63	1,59	1,38				
1835	10,49	11,91	18,14	9,73	20,10	12,47	4,27		6,28	7,39	8,31	4,95	6,03	3,93	11,06	10,78	2,62	4,06	11,38	6,06	8,27	11,72		
2040	12,70	14,32	31,28	13,22	20,59	20,19	7,58		12,30	7,50	10,33	4,10	8,14	6,89	11,46	16,24	3,06	8,89	12,78	5,80	12,25	10,94		
2070	3,47					5,54								2,07	0,82					1,18				
2244	6,84	7,19	17,80	7,31	7,60	11,94	4,77		8,14	5,57	4,02	2,37	4,51	4,90	3,99	6,36		5,36	5,94	2,91	4,45	3,85		
2431	15,86	16,71	32,41	13,58	13,57	26,74	11,78	25,99	21,07	14,92	12,17	14,12	13,05	18,51	11,87	10,91	13,56	12,63	18,44	13,30	14,54	15,54		
2605	7,89	10,73	13,89	10,61	10,05	11,05	6,21		10,89	7,23	4,92	3,39	4,46	6,02	4,52	4,47	3,34	6,42	6,27	5,26	4,20	4,58		
2792	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00		
2966	10,29	16,76	14,07	14,54	11,78	12,80	11,29		13,09	9,01	5,31	7,46	6,21	7,14	6,36	3,58		5,32	5,29	4,36	5,74	4,77		
3212	2,93	5,90									4,54	3,54												
3241	4,35	4,35									5,81	3,62	3,56	1,86	1,63	2,20	1,27		1,55	1,06	1,60	1,45	1,11	3,13
3602	16,26	17,54	8,90	12,98	10,97	6,60	27,45	13,51	8,78	18,09	16,96	12,74	12,84	11,75	9,94	8,57	11,29	8,71	10,34	11,62	5,05	20,57		
3691																								
3776	2,34	3,22																						
3776	2,34	3,22					6,94	11,37	6,35	3,24	3,32	2,51	7,11	2,46	2,83	1,47	2,16	4,41	1,20	2,64	1,61	3,56		
4051	2,24																							
4051	2,24																							
4051	2,24						3,12															1,05		
4413	2,68																							
4413	2,68																							
4413	2,68						3,05															1,46		

APÊNDICE D - TESTE DE MANN-WHITNEY

Variável	Significância	Decisão
1579	0,000	Rejeitar hipótese nula
1783	0,027	Rejeitar hipótese nula
1835	0,002	Rejeitar hipótese nula
2040	0,000	Rejeitar hipótese nula
2070	0,737	Aceitar hipótese nula
2244	0,000	Rejeitar hipótese nula
2431	0,003	Rejeitar hipótese nula
2605	0,000	Rejeitar hipótese nula
2966	0,001	Rejeitar hipótese nula
3211	0,019	Rejeitar hipótese nula
3241	0,000	Rejeitar hipótese nula
3602	0,761	Aceitar hipótese nula
3690	0,835	Aceitar hipótese nula
3776	0,296	Aceitar hipótese nula
4052	0,785	Aceitar hipótese nula
4413	0,511	Aceitar hipótese nula

Hipótese nula = A distribuição das variáveis é a mesma nos dois grupos.

Nível de significância = 0,05

APÊNDICE E – ANÁLISE DESCRITIVA E EXPLORATÓRIA DOS PICOS

m/z	Controles					Pacientes				
	V. min.	V. max.	1º quartil	mediana	3º quartil	V. min.	V. max.	1º quartil	mediana	3º quartil
1579	0,00	2,27	0,00	0,00	0,86	0,00	10,05	1,20	4,32	7,22
1783	0,00	2,41	0,00	0,00	1,30	0,00	10,20	0,00	2,17	4,48
1835	0,00	20,10	4,78	8,29	11,5	0,00	82,93	8,24	18,70	44,63
2040	0,00	31,28	7,35	11,20	13,49	10,42	47,83	14,18	24,41	39,22
2070	0,00	5,54	0,00	0,00	0,21	0,00	5,17	0,00	0,00	1,85
2244	0,00	17,80	3,95	5,13	7,22	6,11	24,29	8,08	11,65	13,51
2431	10,91	32,41	12,94	14,33	18,46	8,40	64,14	17,91	25,34	40,15
2605	0,00	13,89	4,47	6,11	10,19	7,33	23,32	9,31	11,08	16,04
2966	0,00	16,76	5,16	6,75	12,03	8,90	26,65	10,19	13,83	20,44
3211	0,00	5,90	0,00	0,00	0,00	0,00	5,54	0,00	2,93	5,21
3241	0,00	5,81	0,00	1,50	3,23	0,00	7,02	2,42	5,30	6,08
3602	5,05	27,45	8,87	11,68	16,43	7,96	18,01	10,81	12,45	14,52
3776	0,00	11,37	1,40	2,58	3,78	0,00	8,91	1,98	3,61	5,53
4052	0,00	3,12	0,00	0,00	0,55	0,00	2,37	0,00	0,00	0,72
4413	0,00	3,05	0,00	0,00	1,03	0,00	1,147	0,00	0,00	0,26

V. min. = Valor mínimo, V. máx. = Valor máximo.

APÊNDICE F – BOXPLOT DAS PORCENTAGENS DAS ÁREAS DOS PICOS AVALIADOS

Paciente 01.

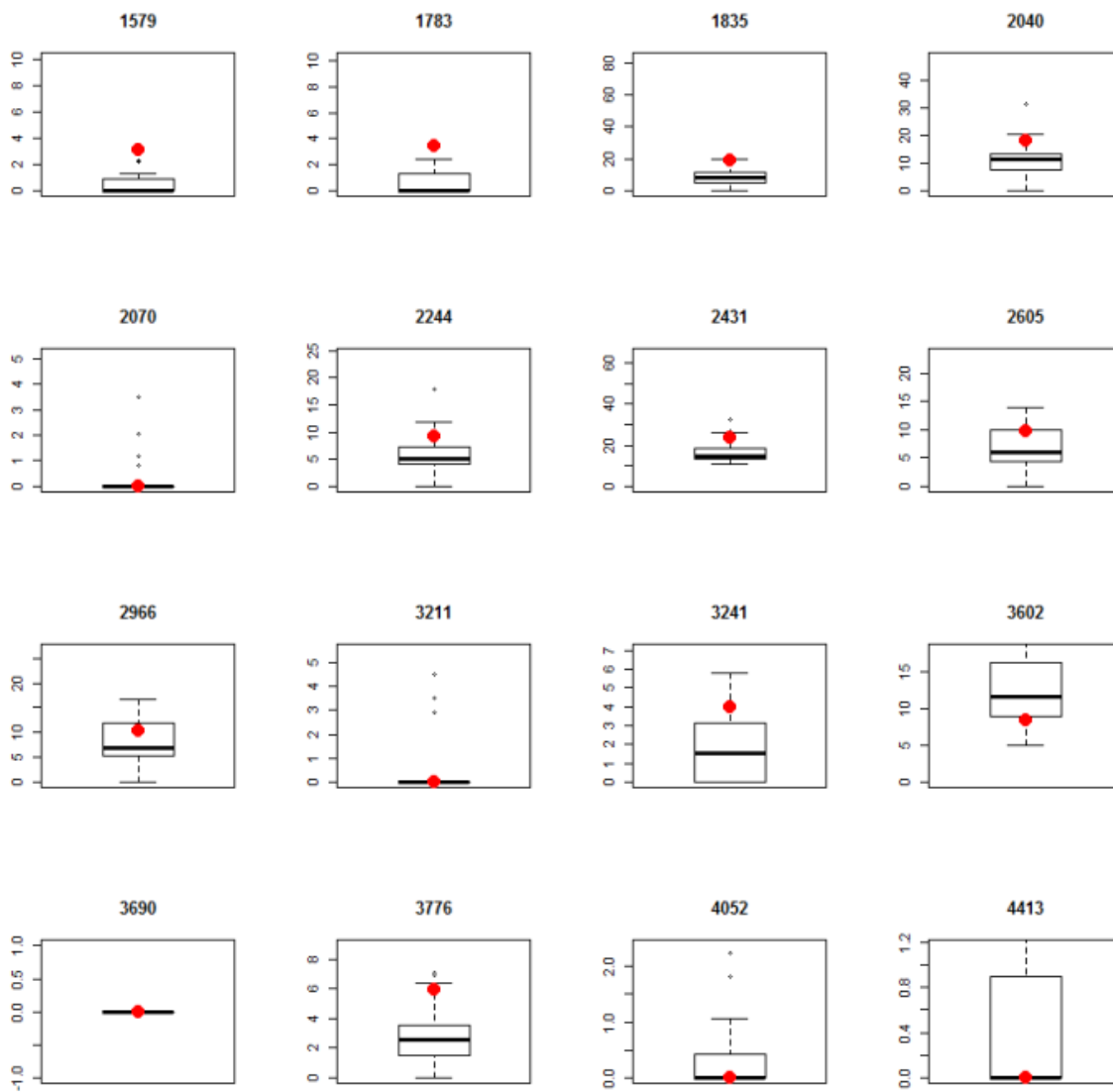


Fig. 10 - *Boxplot* de cada espécie molecular das amostras, com o paciente representado pelo círculo sólido. O número que aparece acima das figuras refere-se à razão massa/carga das estruturas de N-glicanos. No eixo Y encontram-se as porcentagens da área dos respectivos picos em relação à área do pico referência (m/z 2792).

APÊNDICE F – *BOXPLOT* DAS PORCENTAGENS DAS ÁREAS DOS PICOS AVALIADOS

Paciente 02.

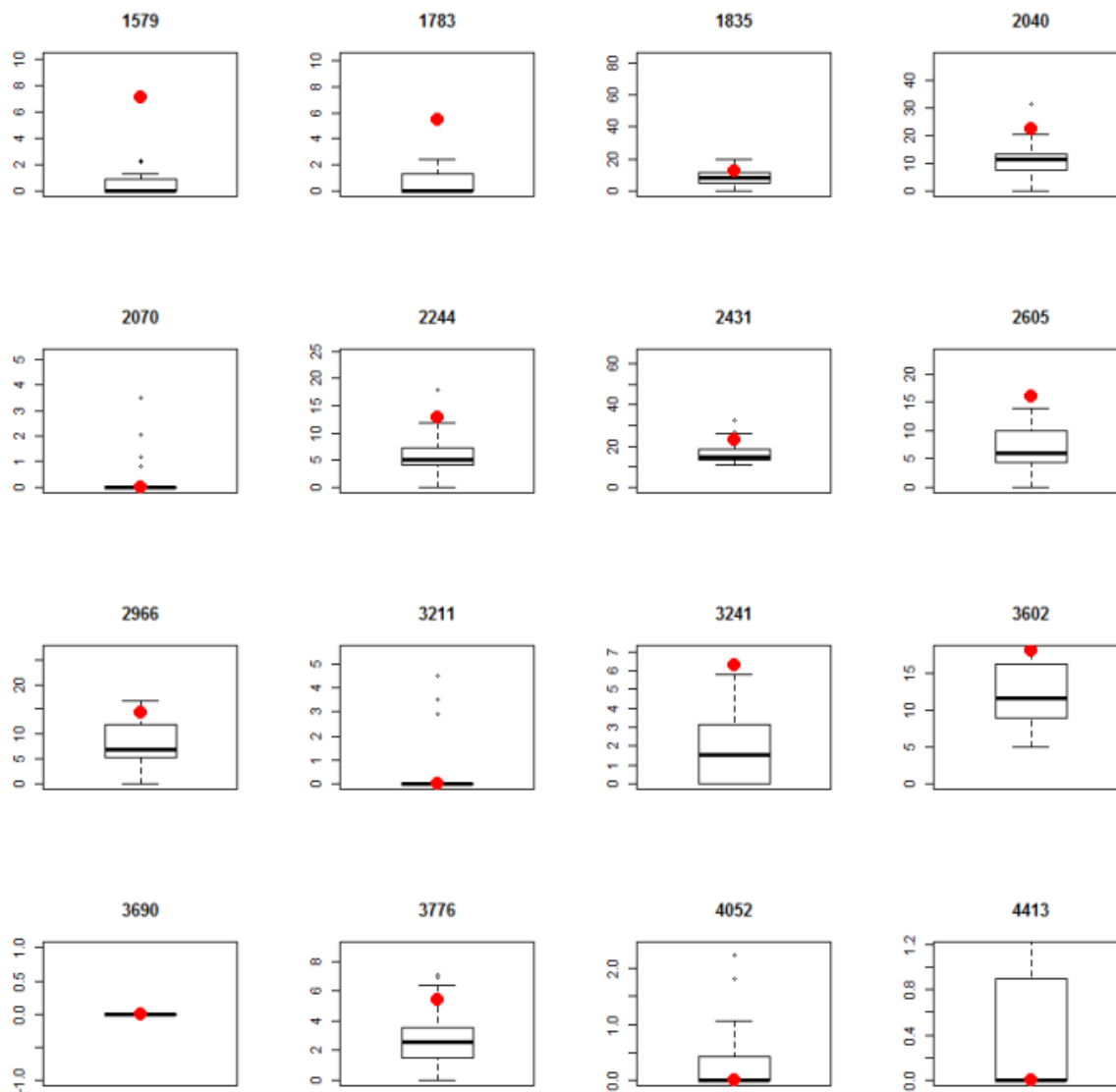


Fig. 11 - *Boxplot* de cada espécie molecular das amostras, com o paciente representado pelo círculo sólido. O número que aparece acima das figuras refere-se à razão massa/carga das estruturas de N-glicanos. No eixo Y encontram-se as porcentagens da área dos respectivos picos em relação à área do pico referência (m/z 2792).

APÊNDICE F – *BOXPLOT* DAS PORCENTAGENS DAS ÁREAS DOS PICOS AVALIADOS

Paciente 03.

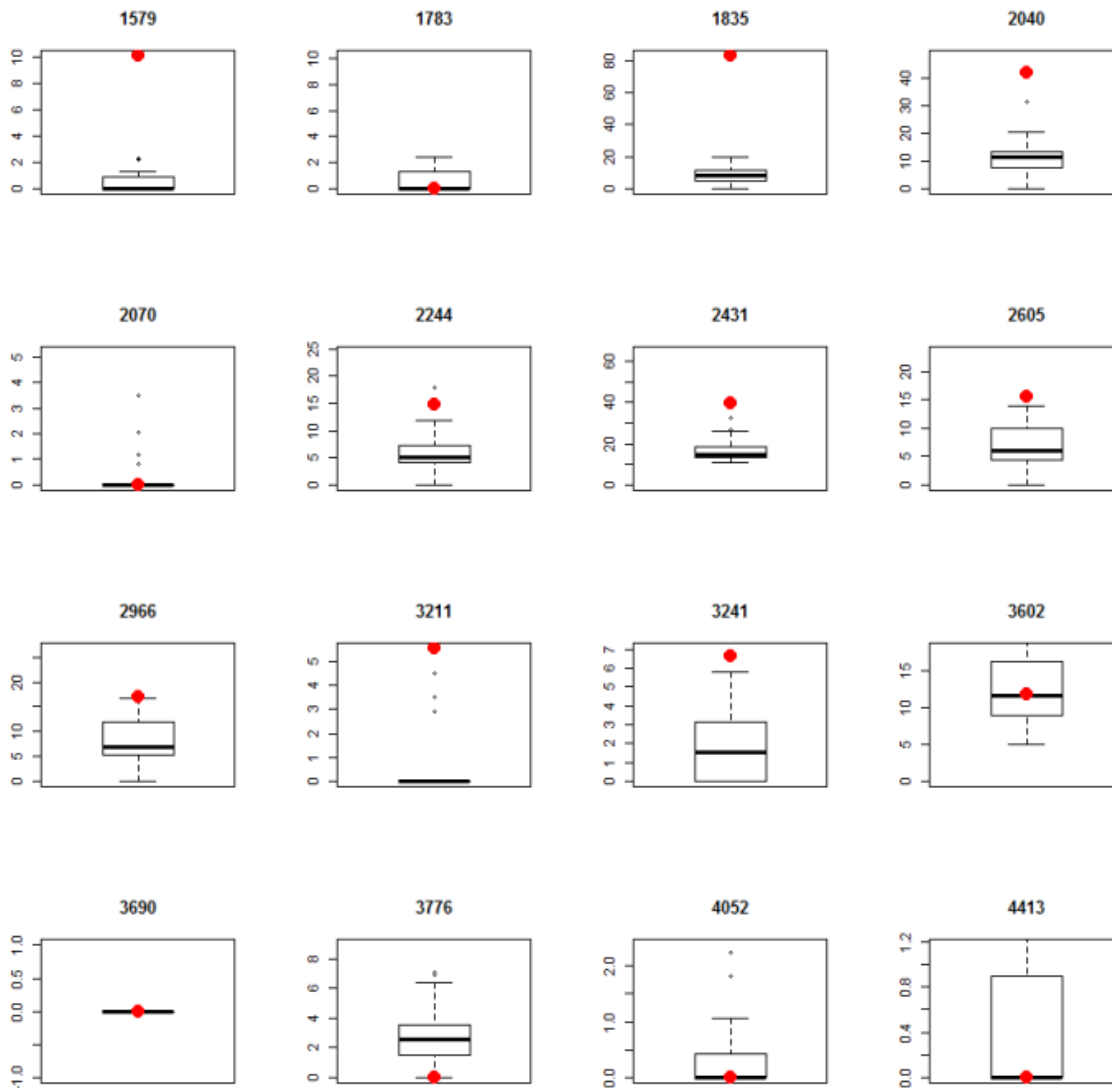


Fig. 12 - *Boxplot* de cada espécie molecular das amostras, com o paciente representado pelo círculo sólido. O número que aparece acima das figuras refere-se à razão massa/carga das estruturas de N-glicanos. No eixo Y encontram-se as porcentagens da área dos respectivos picos em relação à área do pico referência (m/z 2792).

APÊNDICE F – *BOXPLOT* DAS PORCENTAGENS DAS ÁREAS DOS PICOS AVALIADOS

Paciente 04.

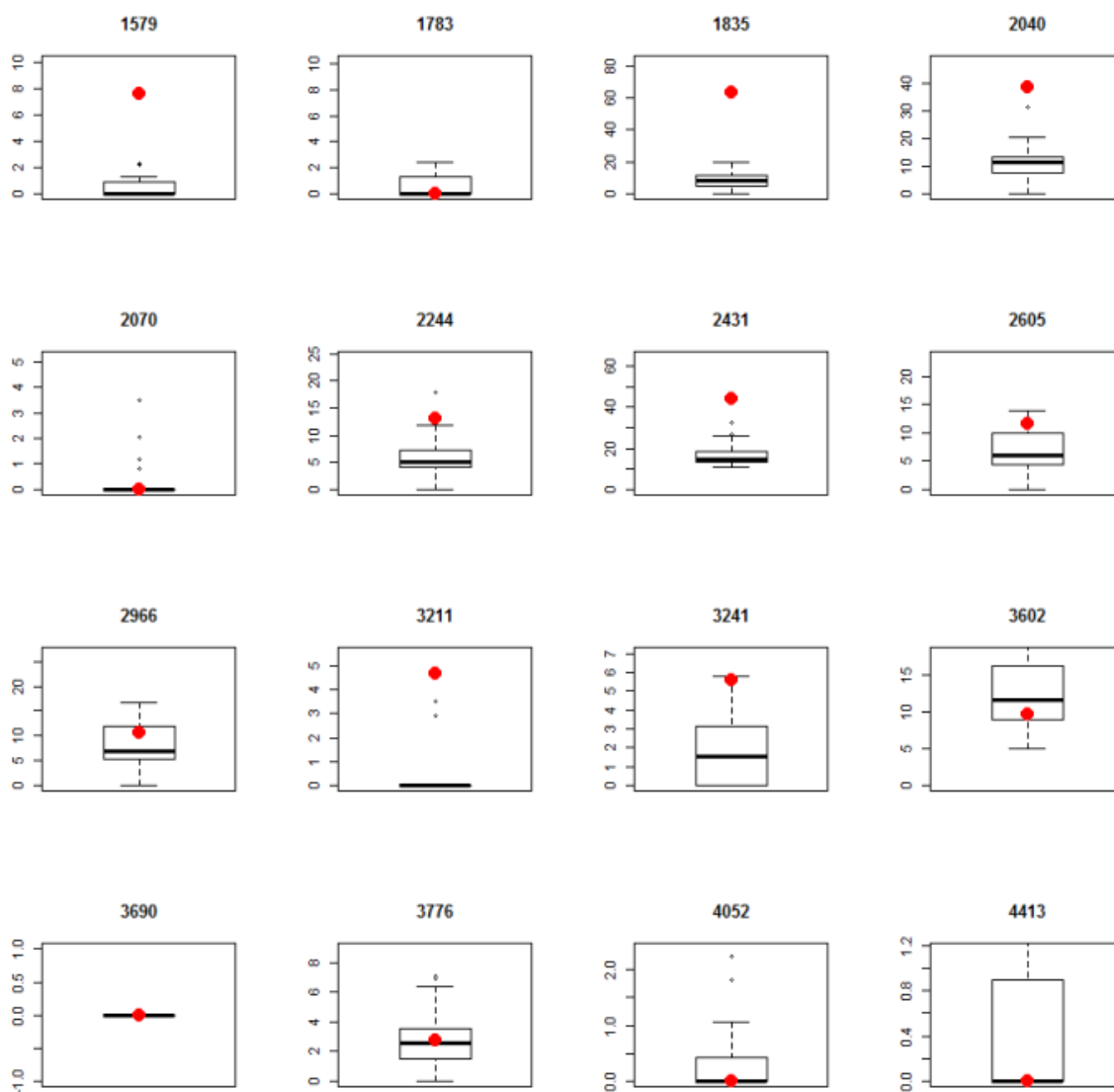


Fig. 13 - *Boxplot* de cada espécie molecular das amostras, com o paciente representado pelo círculo sólido. O número que aparece acima das figuras refere-se à razão massa/carga das estruturas de N-glicanos. No eixo Y encontram-se as porcentagens da área dos respectivos picos em relação à área do pico referência (m/z 2792).

APÊNDICE F – *BOXPLOT* DAS PORCENTAGENS DAS ÁREAS DOS PICOS AVALIADOS

Paciente 05.

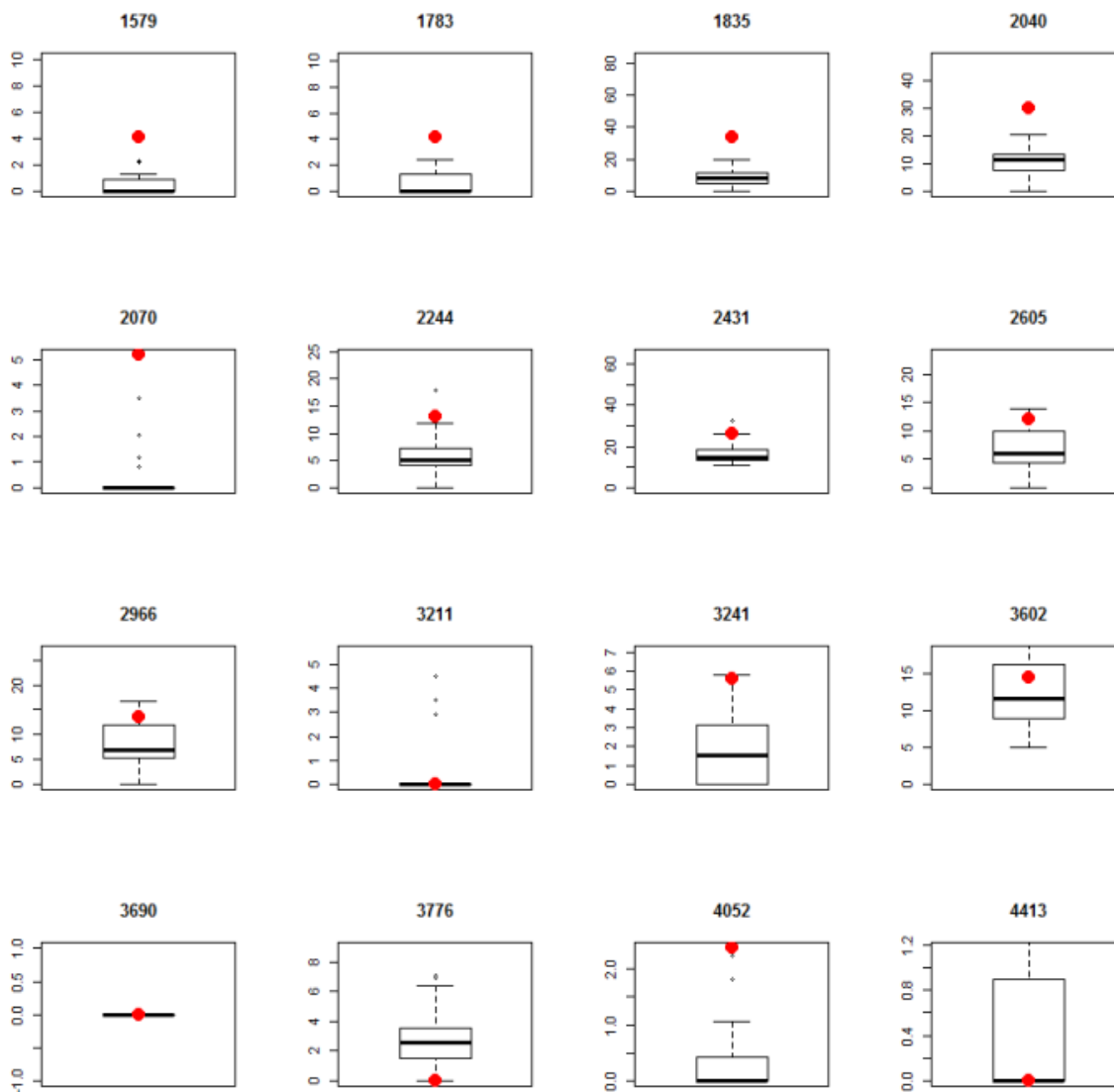


Fig. 14 - *Boxplot* de cada espécie molecular das amostras, com o paciente representado pelo círculo sólido. O número que aparece acima das figuras refere-se à razão massa/carga das estruturas de N-glicanos. No eixo Y encontram-se as porcentagens da área dos respectivos picos em relação à área do pico referência (m/z 2792).

APÊNDICE F – *BOXPLOT* DAS PORCENTAGENS DAS ÁREAS DOS PICOS AVALIADOS

Paciente 06.

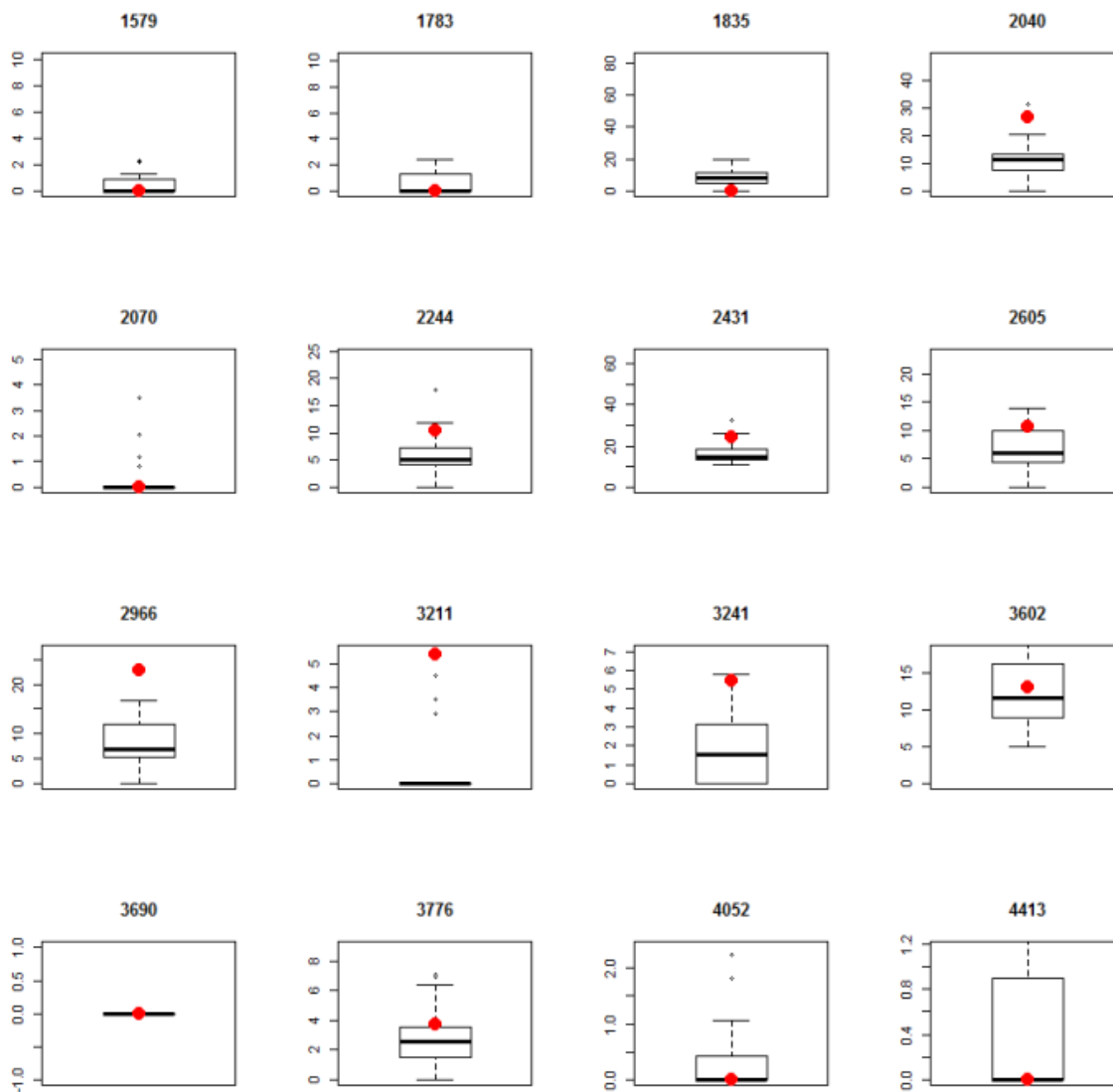


Fig. 15 - *Boxplot* de cada espécie molecular das amostras, com o paciente representado pelo círculo sólido. O número que aparece acima das figuras refere-se à razão massa/carga das estruturas de N-glicanos. No eixo Y encontram-se as porcentagens da área dos respectivos picos em relação à área do pico referência (m/z 2792).

APÊNDICE F – BOXPLOT DAS PORCENTAGENS DAS ÁREAS DOS PICOS AVALIADOS

Paciente 07.

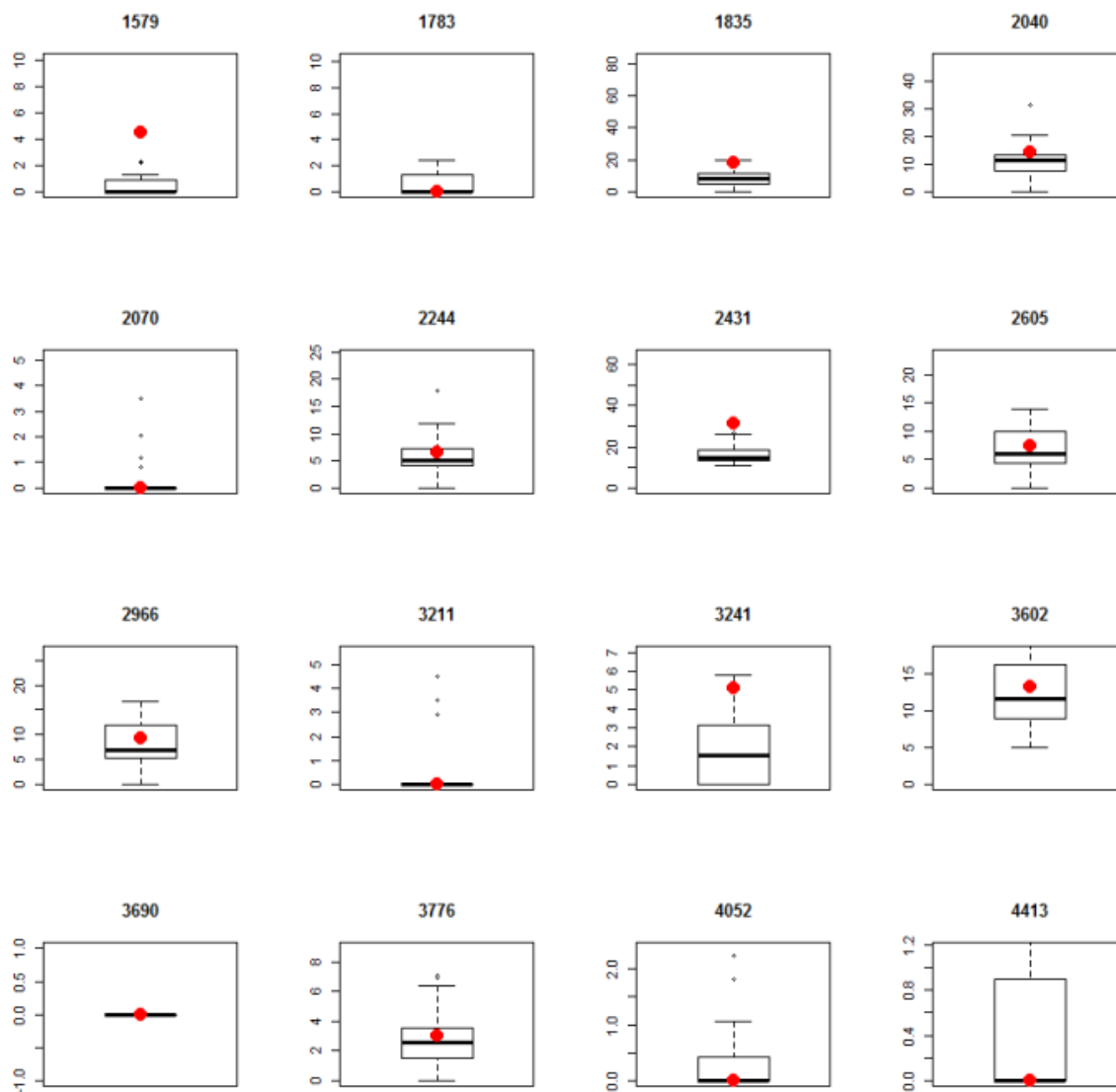


Fig. 16 - *Boxplot* de cada espécie molecular das amostras, com o paciente representado pelo círculo sólido. O número que aparece acima das figuras refere-se à razão massa/carga das estruturas de N-glicanos. No eixo Y encontram-se as porcentagens da área dos respectivos picos em relação à área do pico referência (m/z 2792).

APÊNDICE F – BOXPLOT DAS PORCENTAGENS DAS ÁREAS DOS PICOS AVALIADOS

Paciente 08.

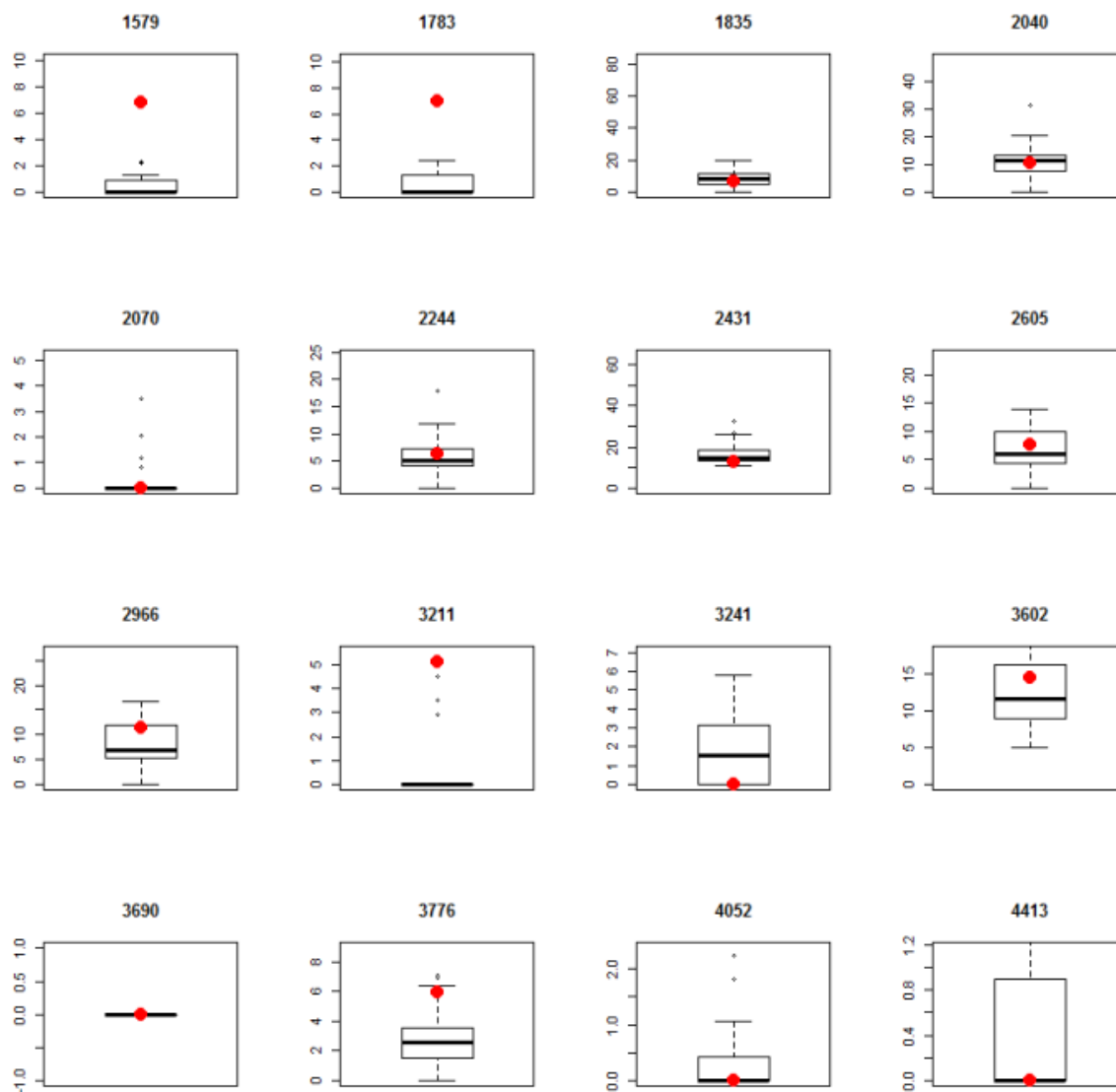


Fig. 17 - *Boxplot* de cada espécie molecular das amostras, com o paciente representado pelo círculo sólido. O número que aparece acima das figuras refere-se à razão massa/carga das estruturas de N-glicanos. No eixo Y encontram-se as porcentagens da área dos respectivos picos em relação à área do pico referência (m/z 2792).

APÊNDICE F – BOXPLOT DAS PORCENTAGENS DAS ÁREAS DOS PICOS AVALIADOS

Paciente 09.

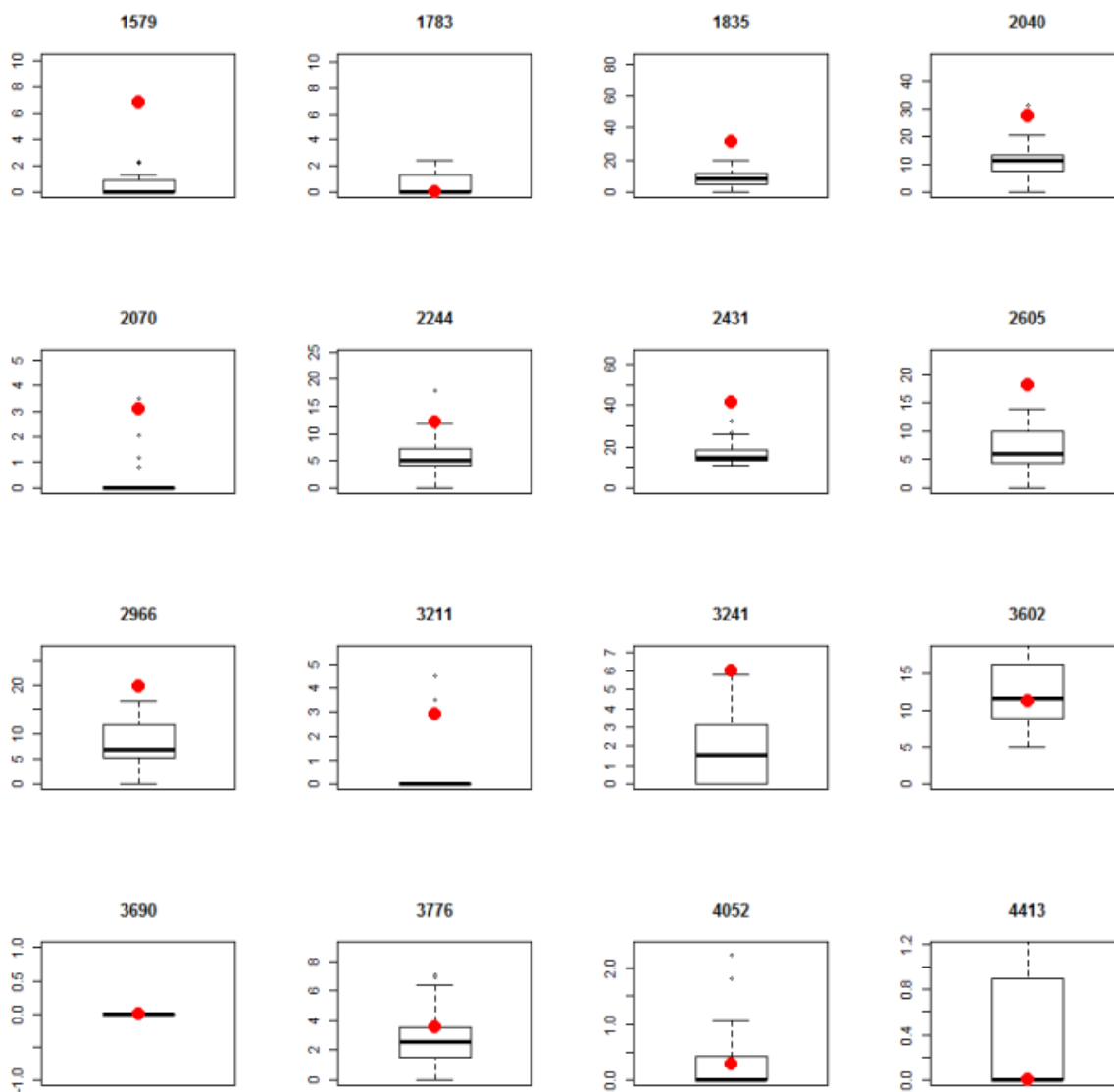


Fig. 18 - *Boxplot* de cada espécie molecular das amostras, com o paciente representado pelo círculo sólido. O número que aparece acima das figuras refere-se à razão massa/carga das estruturas de N-glicanos. No eixo Y encontram-se as porcentagens da área dos respectivos picos em relação à área do pico referência (m/z 2792).

APÊNDICE F – BOXPLOT DAS PORCENTAGENS DAS ÁREAS DOS PICOS AVALIADOS

Paciente 10.

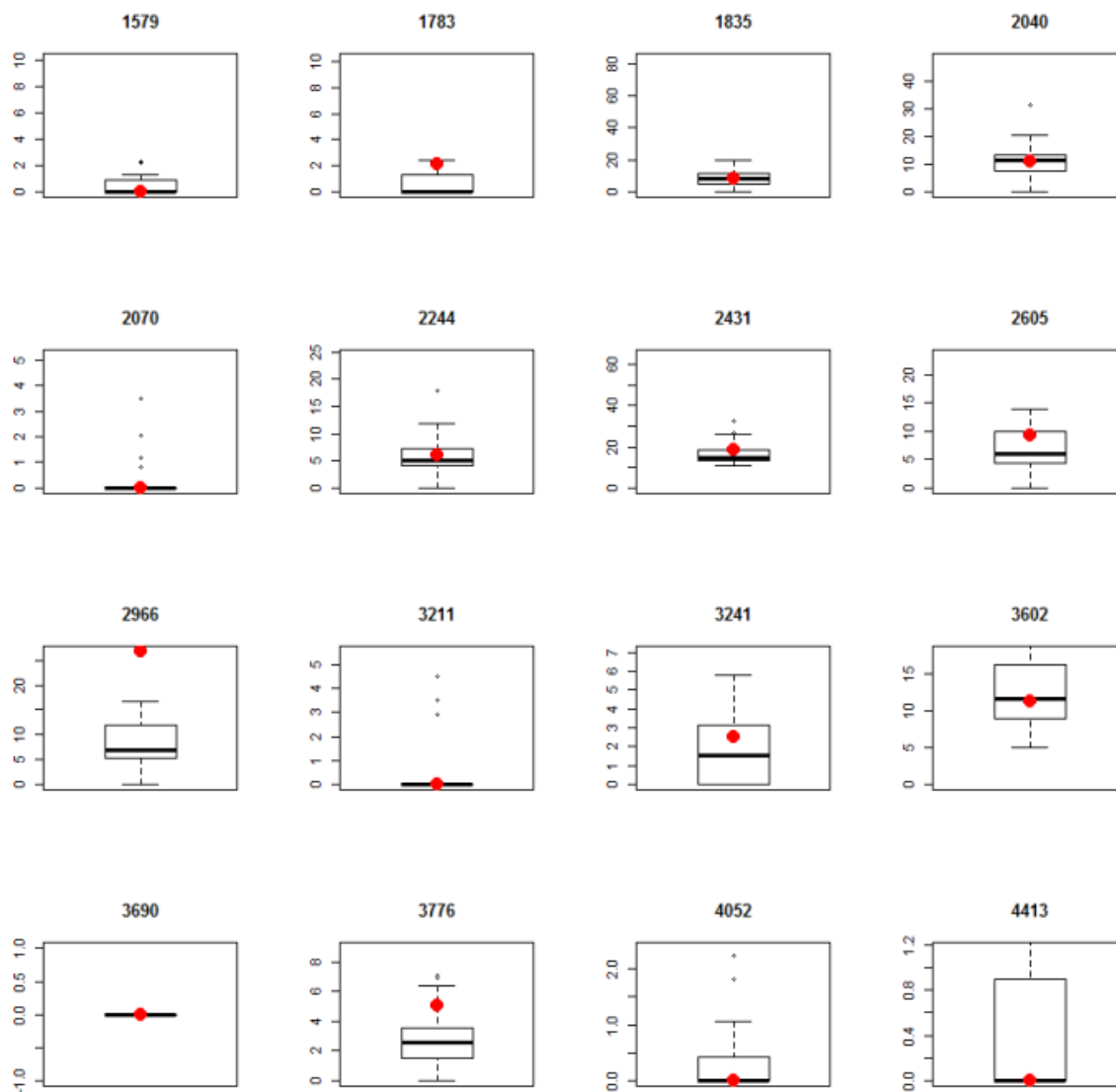


Fig. 19 - *Boxplot* de cada espécie molecular das amostras, com o paciente representado pelo círculo sólido. O número que aparece acima das figuras refere-se à razão massa/carga das estruturas de N-glicanos. No eixo Y encontram-se as porcentagens da área dos respectivos picos em relação à área do pico referência (m/z 2792).

APÊNDICE F – BOXPLOT DAS PORCENTAGENS DAS ÁREAS DOS PICOS AVALIADOS

Paciente 11.

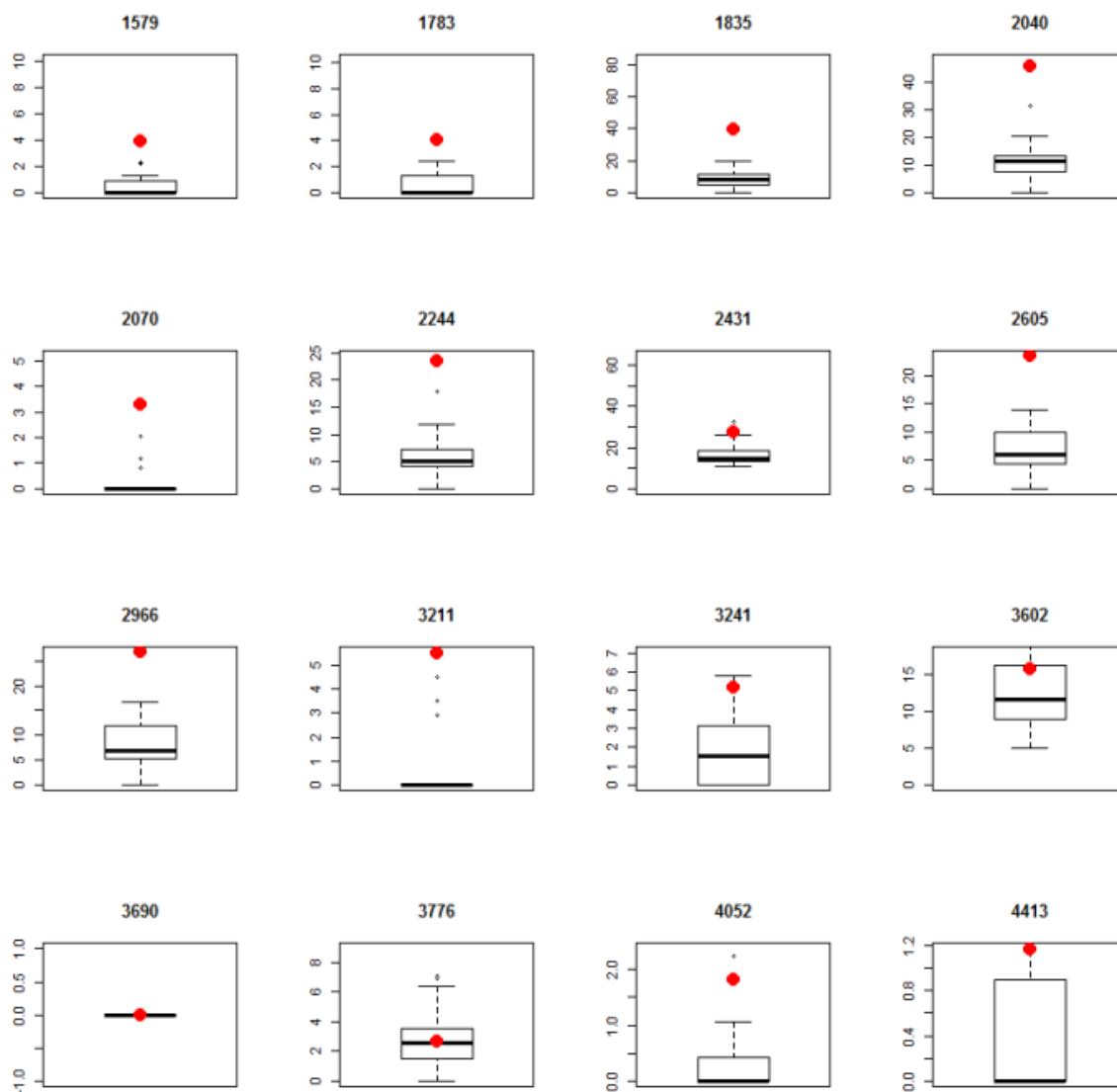


Fig. 20 - *Boxplot* de cada espécie molecular das amostras, com o paciente representado pelo círculo sólido. O número que aparece acima das figuras refere-se à razão massa/carga das estruturas de N-glicanos. No eixo Y encontram-se as porcentagens da área dos respectivos picos em relação à área do pico referência (m/z 2792).

APÊNDICE F – BOXPLOT DAS PORCENTAGENS DAS ÁREAS DOS PICOS AVALIADOS

Paciente 12.

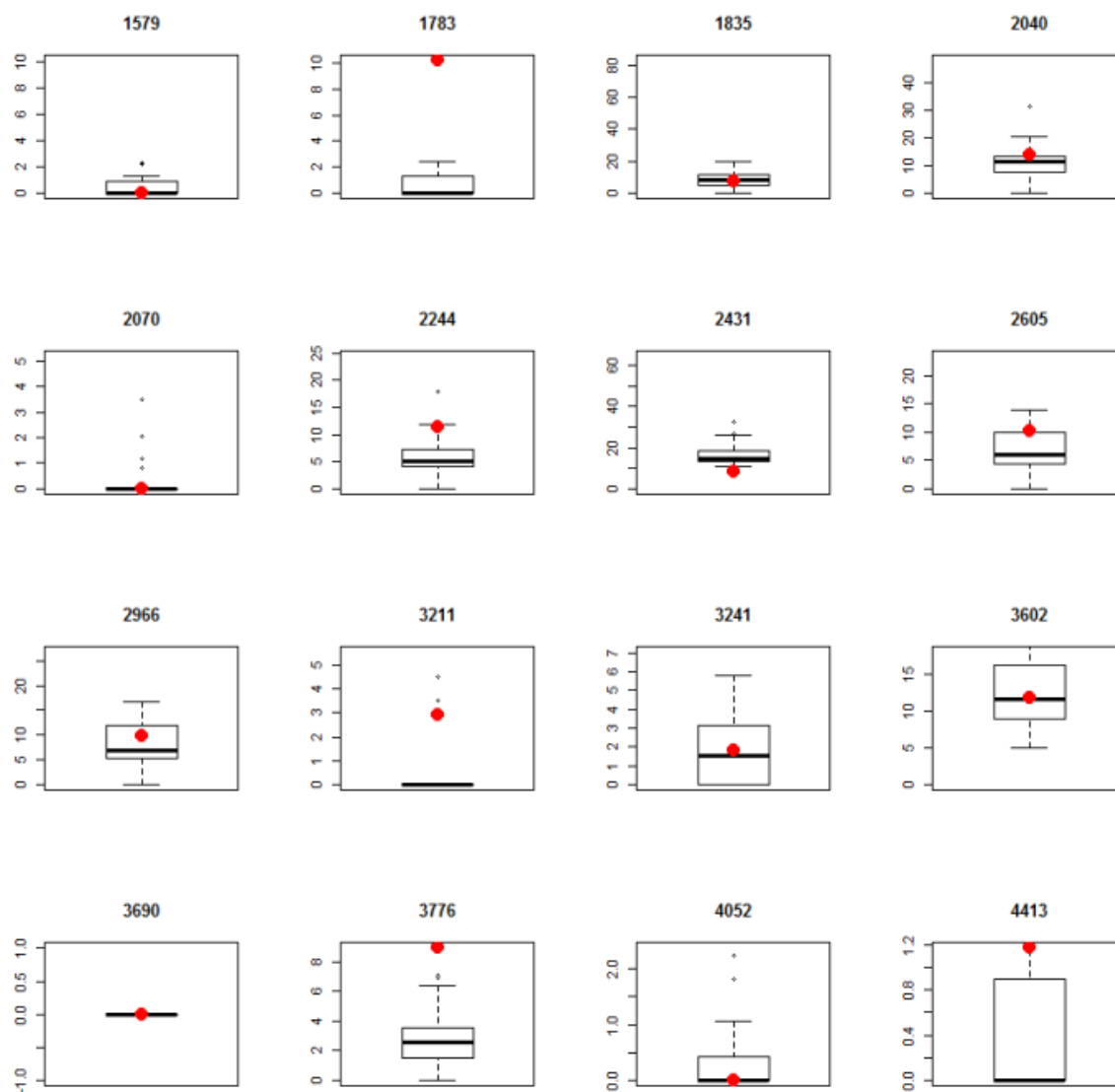


Fig. 21 - *Boxplot* de cada espécie molecular das amostras, com o paciente representado pelo círculo sólido. O número que aparece acima das figuras refere-se à razão massa/carga das estruturas de N-glicanos. No eixo Y encontram-se as porcentagens da área dos respectivos picos em relação à área do pico referência (m/z 2792).

APÊNDICE F – BOXPLOT DAS PORCENTAGENS DAS ÁREAS DOS PICOS AVALIADOS

Paciente 13.

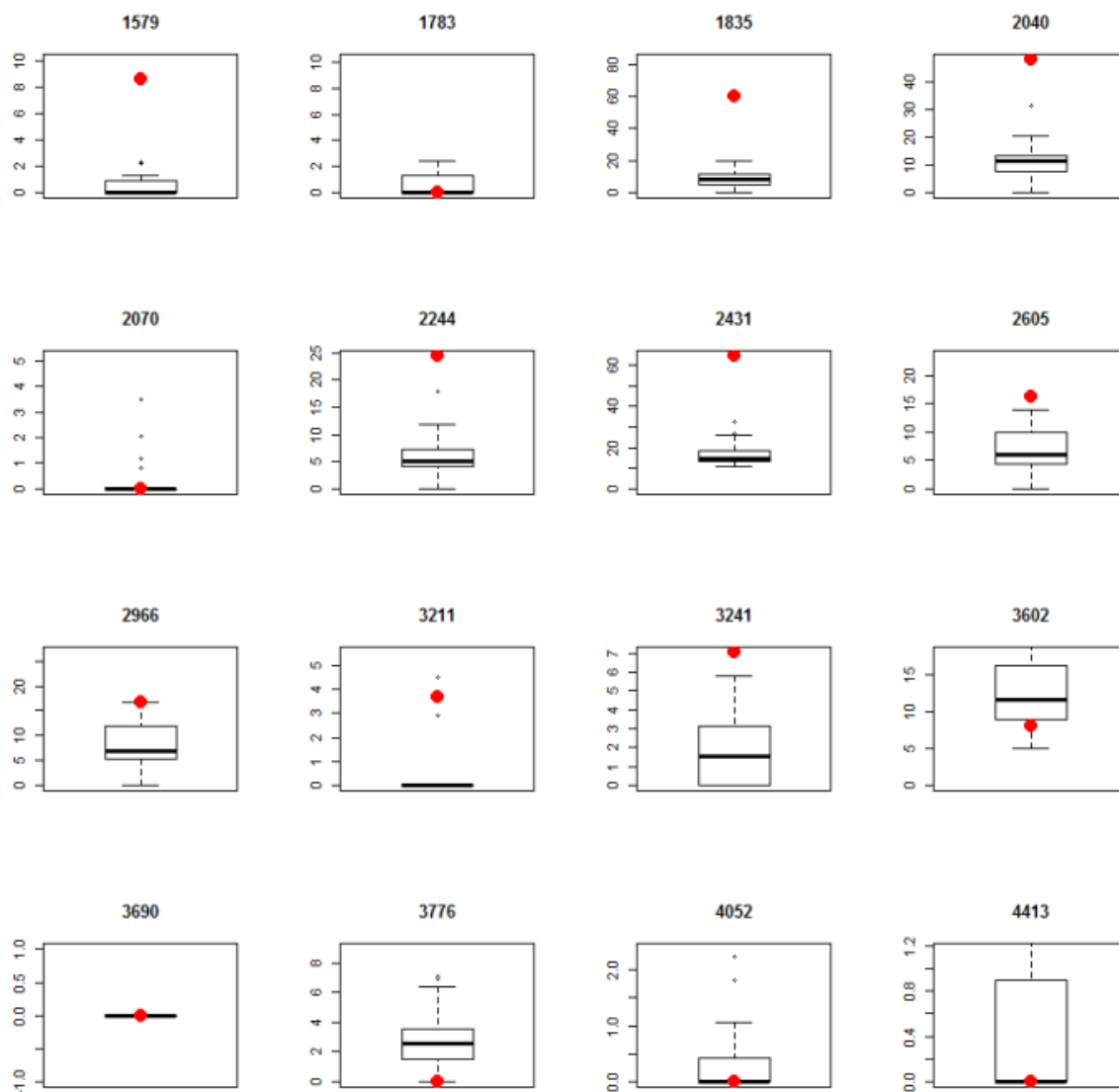


Fig. 22 - *Boxplot* de cada espécie molecular das amostras, com o paciente representado pelo círculo sólido. O número que aparece acima das figuras refere-se à razão massa/carga das estruturas de N-glicanos. No eixo Y encontram-se as porcentagens da área dos respectivos picos em relação à área do pico referência (m/z 2792).

APÊNDICE F – BOXPLOT DAS PORCENTAGENS DAS ÁREAS DOS PICOS AVALIADOS

Paciente 14.

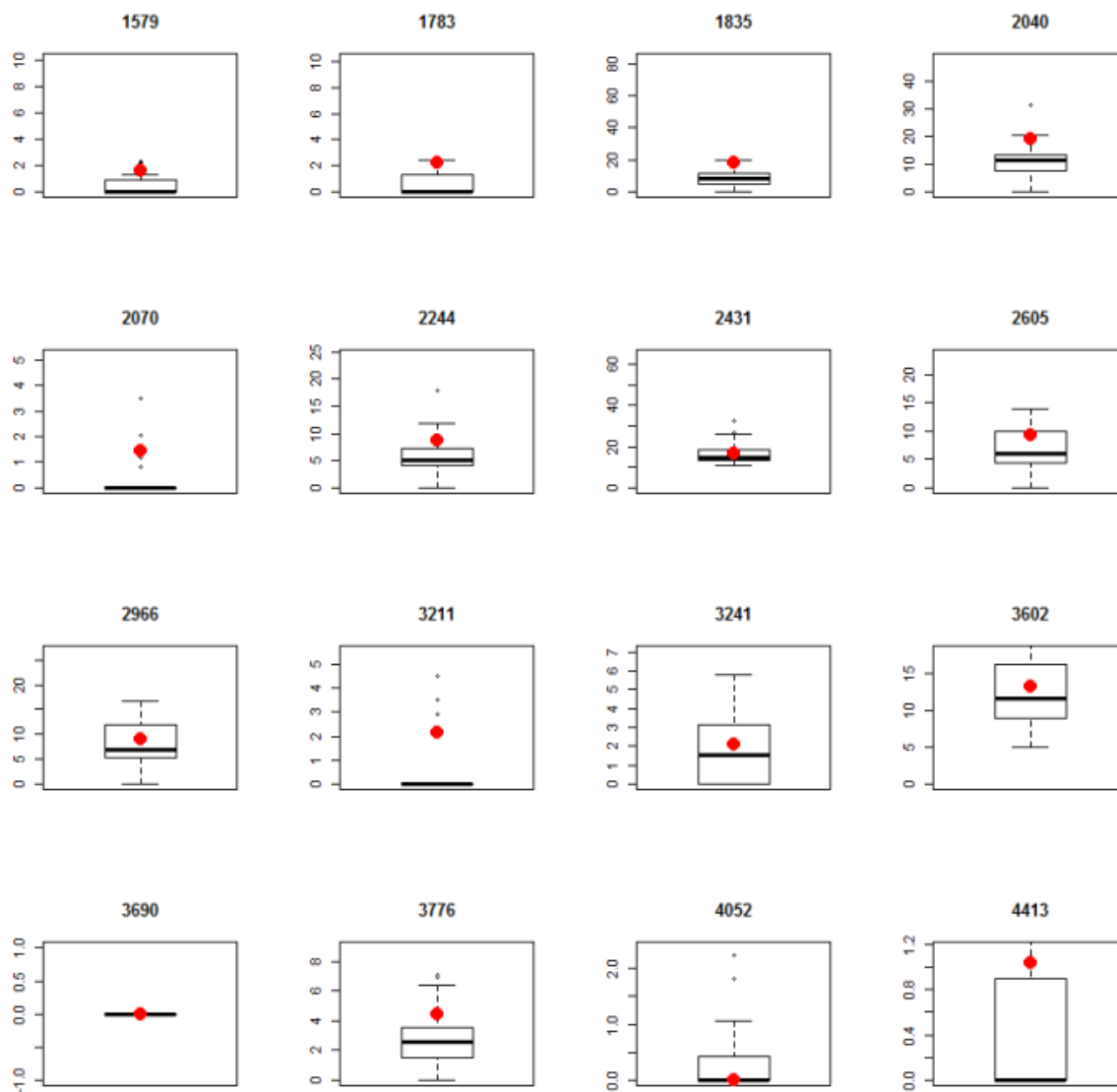


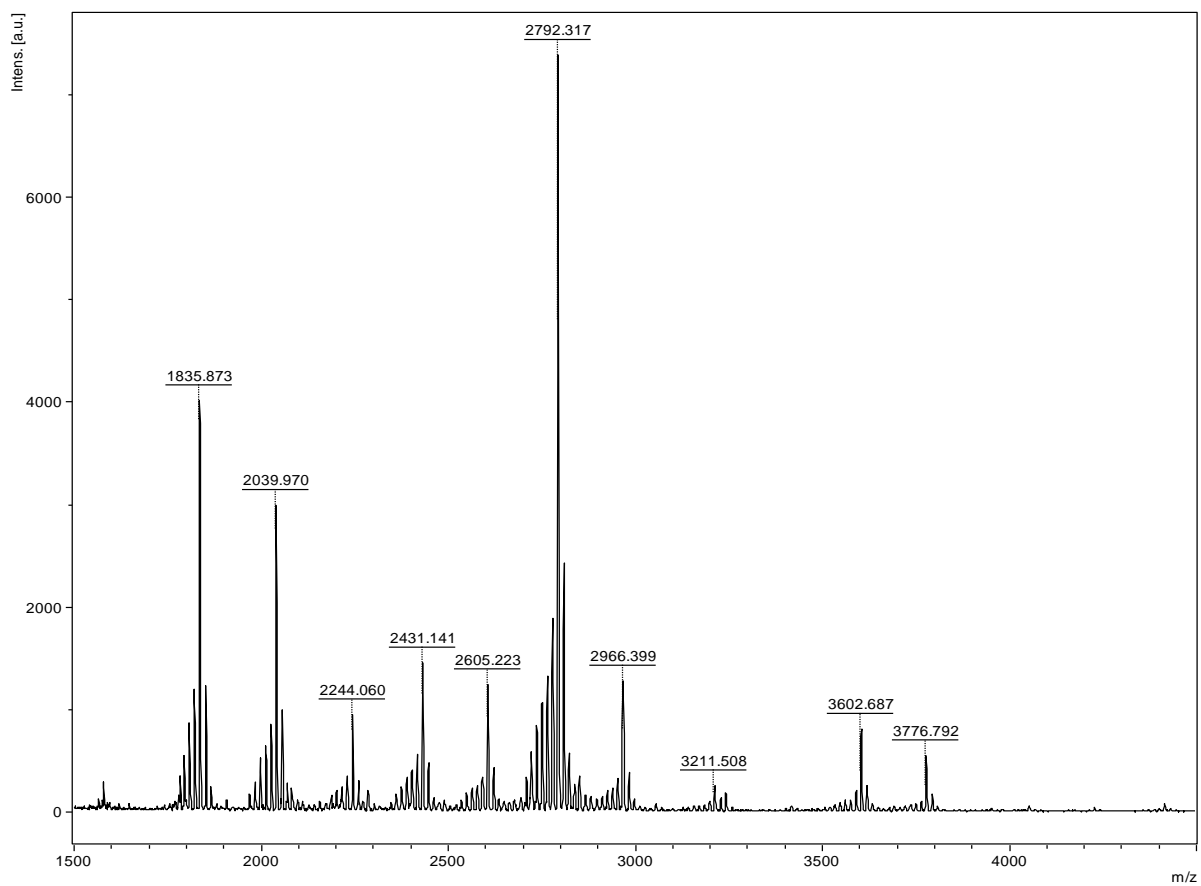
Fig. 23 - *Boxplot* de cada espécie molecular das amostras, com o paciente representado pelo círculo sólido. O número que aparece acima das figuras refere-se à razão massa/carga das estruturas de N-glicanos. No eixo Y encontram-se as porcentagens da área dos respectivos picos em relação à área do pico referência (m/z 2792).

**APÊNDICE G – PORCENTAGENS DAS ÁREAS DOS PICOS PRESENTES NOS PACIENTES, NORMALIZADOS
PELA ÁREA DO PICO REFERÊNCIA m/z 2792**

Pacientes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Diagnóstico	S/D	S/D	ATP6V0A2	ATP6V0A2	S/D	S/D	S/D	Man1B1	S/D	PYCR1	S/D	S/D	S/D	S/D
1579	3,05	7,09	10,05	7,62	4,14		4,50	6,80	6,80		3,87		8,60	1,61
1783	3,45	5,50			4,15			6,99		2,16	4,03	10,20		2,18
1835	19,12	12,61	82,93	63,08	33,88		18,29	6,16	31,38	8,54	39,51	7,36	59,99	18,17
2040	17,84	22,33	41,68	38,40	30,05	26,48	14,32	10,42	27,50	10,75	45,71	13,75	47,83	19,21
2070					5,17				3,07		3,30			1,44
2244	9,22	12,72	14,68	13,09	13,12	10,46	6,54	6,28	12,01	6,11	23,32	11,29	24,29	8,60
2431	23,73	22,94	39,62	43,92	26,38	24,30	30,98	12,63	41,73	18,48	27,19	8,40	64,14	16,21
2605	9,83	15,95	15,43	11,62	12,08	10,54	7,33	7,56	18,11	9,35	23,32	10,22	16,30	9,18
2792	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2966	10,34	14,19	16,87	10,70	13,48	22,74	9,28	11,50	19,68	26,65	26,65	9,74	16,58	8,90
3211			5,54	4,68		5,41		5,15	2,94		5,49	2,93	3,70	2,15
3241	4,00	6,29	6,62	5,58	5,55	5,41	5,12		6,01	2,53	5,19	1,81	7,02	2,10
3602	8,47	18,01	11,89	9,65	14,59	13,02	13,34	14,50	11,19	11,28	15,80	11,86	7,96	13,24
3690														
3776	5,93	5,40		2,77		3,69	3,04	5,93	3,53	5,07	2,64	8,91		4,43
4052					2,37				0,29		1,81			
4413											1,16	1,17		1,03

S/D = Sem diagnóstico

APÊNDICE H – ESPECTRO DA PACIENTE 15, COM DIAGNÓSTICO DE PYCR1, EXCLUÍDA DO ESTUDO, IRMÃ DA PACIENTE 10



ANEXO A – DISTÚRBIOS CONGÊNTOS DE GLICOSILAÇÃO

Disorder	Gene	Function	Disorder OMIM	Gene OMIM	Main Clinical Features	Year	Reference
N-Linked Pathway							
DPAGT1 – CDG	<i>DPAGT1</i>	GlcNAc-1-P transferase	608093	191350	ID, Hy, Sz, M, infections, early death & CMS	2003	PMID: 12872255
ALG1 – CDG	<i>ALG1</i>	β1,4 Mannosyltransferase	608540	605907	ID, Hy, Sz, M, infections, early death	2004	PMID: 14709599 PMID: 14973778 PMID: 14973782
ALG2 – CDG ALG2 – CMS	<i>ALG2</i>	α1,3 Mannosyltransferase	607906	607905	ID, Hy, Sz, infections, hypomyelination, hepatomegaly, early death Congenital Myasthenic Syndrome	2003 2013	PMID: 12684507 PMID: 23404334
ALG3 – CDG	<i>ALG3</i>	α1,3 Mannosyltransferase	601110	608750	ID, Hy, Sz, M, optic nerve atrophy	1999	PMID: 10581255
ALG6 – CDG	<i>ALG6</i>	α1,3 Glucosyltransferase	603147	604566	ID, Hy, Sz, M, ataxia	1999	PMID: 10359825
ALG8 – CDG	<i>ALG8</i>	α1,3 Glucosyltransferase	608104	608103	DD, hepatomegaly, protein-losing enteropathy, coagulopathy, ascites, renal failure, early death	2003	PMID: 12480927
ALG9 – CDG	<i>ALG9</i>	α1,2 Mannosyltransferase	608776	606941	ID, Hy, Sz, hepatomegaly	2004	PMID: 15148656
ALG11 – CDG	<i>ALG11</i>	α1,2 Mannosyltransferase	613661	613666	ID, Hy, Sz, deafness, dysmorphism	2010	PMID: 20080937
ALG12 – CDG	<i>ALG12</i>	α1,6 Mannosyltransferase	607143	607144	ID, Hy, Sz, M, recurrent infections	2002	PMID: 11983712 PMID: 12217961
ALG13 – CDG	<i>ALG13</i>	UDP-GlcNAc transferase	300884	300776	M, Sz, hepatomegaly, horizontal nystagmus, optic nerve atrophy, infections	2012	PMID: 22492991
ALG14 – CMS	<i>ALG14</i>	UDP-GlcNAc transferase	616227	612866	Congenital Myasthenic Syndrome	2013	PMID: 23404334
RFT1 – CDG	<i>RFT1</i>	Man5GlcNAc2 flippase	612015	611908	ID, Hy, Sz, M, hepatomegaly, coagulopathy, deafness	2008	PMID: 18313027
TUSC3 – CDG	<i>TUSC3</i>	Subunit of the OST complex	611093	601385	NSID (Non-syndromic intellectual disability)	2008	PMID: 18452889 PMID: 18455129
MAGT1 – CDG	<i>MAGT1</i>	Subunit of the OST complex	300716	300715	XLNSID (X-Linked Non-syndromic intellectual disability)	2008	PMID: 18455129
DDOST – CDG	<i>DDOST</i>	Subunit of the OST complex	614507	602202	ID, DD, failure to thrive, gastroesophageal reflux, ear infections, oromotor dysfunction	2012	PMID: 22305527

STT3A – CDG	<i>STT3A</i>	Subunit of the OST complex	615596	601134	ID, DD, H, M, Sz, failure to thrive	2013	PMID: 23842455
STT3B – CDG	<i>STT3B</i>	Subunit of the OST complex	615597	608605	ID, DD, H, M, Sz, failure to thrive, thrombocytopenia, genital abnormalities	2013	PMID: 23842455
NGLY1 – CDG	<i>NGLY1</i>	N-Glycanase-1	615273	610661	ID, DD, Sz, abnormal liver function	2012	PMID: 22581936
SSR4 – CDG	<i>SSR4</i>	Signal sequence receptor, delta	300934	300090	M, ID, Sz, gastroesophageal reflux	2013	PMID: 24218363
SSR3 – CDG	<i>SSR3</i>	Signal sequence receptor, gamma		606213	Sz, ID, DD, M, abnormal brain structure		
MGAT2 – CDG	<i>MGAT2</i>	GlcNAc-transferase II	212066	602616	ID, feeding problems severe diarrhea, growth retardation, dysmorphism	1996	PMID: 8808595
MOGS – CDG	<i>MOGS</i>	α 1,2 Glucosidase	606056	601336	Hy, Sz, hepatomegaly, hypoventilation, feeding problems, dysmorphism, fatal, unique tetrasaccharide in urine.	2000	PMID: 10788335
MAN1B1 – CDG	<i>MAN1B1</i>	α 1,2 Mannosidase	614202	604346	NSID (Non-syndromic intellectual disability), delayed motor and speech development, variable dysmorphic features, truncal obesity and macrocephaly	2011	PMID: 21763484
I-cell disease	<i>GNPTAB</i>	GlcNAc-1-P transferase	252500 252600	607840	ID, congenital dislocation of the hip, thoracic deformities, hernia, hyperplastic gums, coarse facial features, restricted joint movement	1981	PMID: 6461005
Autosomal Dominant Polycystic Liver Disease	<i>PRKCSH</i>	Glucosidase II Subunit Beta	174050	177060	Autosomal Dominant polycystic liver disease	2003	PMID: 12529853 PMID: 12577059
Congenital Severe Neutropenia	<i>JAGN1</i>	Endoplasmic Reticulum organization	616022	616012	Congenital Severe Neutropenia, recurrent infections	2014	PMID: 25129144 PMID: 25129145
Potential to Effect Multiple Pathways							
PMM2 – CDG	<i>PMM2</i>	Conversion of Man-6-P to Man-1-P	212065	601785	ID, Hy, Sz, strabismus, cerebellar hypoplasia, failure to thrive, cardiomyopathy. 20% lethality in the first 5 years	1997	PMID: 9140401
MPI – CDG	<i>MPI</i>	Conversion of Fruct-6-P and Man-6-P	602579	154550	Hepatic fibrosis, coagulopathy, hypoglycemia, protein-losing enteropathy, vomiting. No neurological symptoms	1998	PMID: 9525984

DHDDS – CDG	<i>DHDDS</i>	Dehydrodolichol Diphosphate Synthase	613861	608172	Retinitis Pigmentosa in Ashkenazi Jews	2011	PMID: 21295282 PMID: 21295283
DOLK – CDG	<i>DOLK</i>	Dol Kinase	610768	610746	ID, Hy, Sz, hypoglycemia, ichthyosis, dilated cardiomyopathy, cardiac failure	2007	PMID: 17273964
SRD5A3 – CDG	<i>SRD5A3</i>	Polyprenol Reductase	612379	611715	ID, Hy, eye and brain malformations, nystagmus, hepatic dysfunction, coagulopathy, ichthyosis	2010	PMID: 20637498
DPM1 – CDG	<i>DPM1</i>	Dol-P-Man synthase complex	608799	603503	ID, Hy, Sz, M, dysmorphism, coagulopathy	2000	PMID: 10642597 PMID: 10642602
DPM2 – CDG	<i>DPM2</i>	Dol-P-Man synthase complex	615042	603564	Dystrglycanopathy, Sz, Hy, M, dysmorphism, cerebellar hypoplasia, early death	2012	PMID: 23109149
DPM3 – CDG	<i>DPM3</i>	Dol-P-Man synthase complex	612937	605951	Dystrglycanopathy, dilated cardiomyopathy, stroke-like episode	2009	PMID: 19576565
MPDU1 – CDG	<i>MPDU1</i>	Man-P-Dol utilization	609180	604041	ID, Sz, failure to thrive, ichthyosis-like skin disorder, severe feeding difficulties	2001	PMID: 11733556 PMID: 11733564
GMPPA – CDG	<i>GMPPA</i>	GDP-Man pyrophosphorylase A	615510	615495	Achalasia, alacrima, and neurological deficits	2013	PMID: 24035193
SLC35C1 – CDG	<i>SLC35C1</i>	GDP-Fuc transporter	266265	605881	ID, Hy, Sz, M, unusual facial appearance, dwarfism, infections with neutrophilia	2001	PMID: 11326279
B4GALT1 – CDG	<i>B4GALT1</i>	β 1,4 Galactosyltransferase	607091	137060	ID, DD, Hy, macrocephaly, Dandy-Walker malformation, coagulopathy, myopathy	2002	PMID: 11901181
SLC35A1 – CDG	<i>SLC35A1</i>	CMP-Sialic acid transporter	603585	605634	I.D, Sz, Ataxia, Bleeding, thrombocytopenia, neutropenia, Renal and Cardiac involvement	2005 2013	PMID: 15576474 PMID: 23873973
SLC35A2 – CDG	<i>SLC35A2</i>	UDP-Gal transporter	300896	314375	ID, Sz, skeletal anomalies	2013	PMID: 23561849
SLC35A3 - CDG	<i>SLC35A3</i>	UDP-GlcNAc transporter	615553	605632	Autism spectrum disorder, Hy, epilepsy and arthrogyposis	2013	PMID: 24031089
SLC39A8 - CDG	<i>SLC39A8</i>	Manganese transporter	616721	608732	Cranial asymmetry, severe infantile spasms with hypsarrhythmia, and dysproportionate dwarfism	2015	PMID: 26637979 PMID: 26637978
COG1 – CDG COG1 – CCMS	<i>COG1</i>	Golgi-to-ER retrograde transport	611209 117650	606973	ID, shortened long bones, facial dysmorphism and cerebriocostomandibular (CCMS-like syndrome)	2009	PMID: 16537452 PMID: 19008299
COG2 – CDG	<i>COG2</i>	Golgi-to-ER retrograde transport	N/A	606974	M, psychomotor retardation, Sz, liver	2014	PMID: 24784932

					dysfunction, hypocupremia, hypoceruloplasminemia		
COG4 - CDG	<i>COG4</i>	Golgi-to-ER retrograde transport	613489	606976	DD, Hy, Sz, nystagmus, hepatosplenomegaly, failure to thrive in infancy with recurrent diarrhea, early death	2009	PMID: 19494034
COG5 - CDG	<i>COG5</i>	Golgi-to-ER retrograde transport	613612	606821	ID, Hy, delayed speech, ataxia	2009	PMID: 19690088
COG6 - CDG	<i>COG6</i>	Golgi-to-ER retrograde transport	614576	606977	Severe neurologic disorder, Sz, vomiting	2010	PMID: 20605848
COG7 - CDG	<i>COG7</i>	Golgi-to-ER retrograde transport	608779	606978	Hy, M, growth retardation, adducted thumbs, failure to thrive, cardiac anomalies, wrinkled skin, early death	2004	PMID: 15107842
COG8 - CDG	<i>COG8</i>	Golgi-to-ER retrograde transport	611182	606979	ID, Hy, Sz	2007	PMID: 17331980 PMID: 17220172
ATP6V0A2 - CDG Wrinkly skin syndrome	<i>ATP6V0A2</i>	Golgi pH Regulator	219200 278250	611716	Cutis laxa, congenital hip dislocation, joint hyperlaxity, dysmorphism, feeding problems, late closure the fontanelles, varying CNS involvement	2008	PMID: 18157129
TMEM165 - CDG	<i>TMEM165</i>	Golgi Regulator pH and Calcium Homeostasis	614727	614726	ID, Hy, M, short stature, dysmorphism, eye abnormalities, hepatomegaly, skeletal dysplasia	2012	PMID: 22683087
TMEM199 - CDG	<i>TMEM199</i>	Golgi trafficking	616829	616815	Mild phenotype of hepatic steatosis, elevated aminotransferases, alkaline phosphatase, and hypercholesterolemia, low serum ceruloplasmin	2016	PMID:26833330
CCDC115 - CDG	<i>CCDC115</i>	Golgi homeostasis	616828	613734	Storage-disease-like phenotype involving hepatosplenomegaly, which regressed with age, highly elevated bone-derived alkaline phosphatase, elevated aminotransferases, and elevated cholesterol, in combination with abnormal copper metabolism and neurological symptoms	2016	PMID:26833332
Congenital myasthenic syndrome	<i>GFPT1</i>	Glutamine-fruct-6-P transaminase 1	610542	138292	Congenital myasthenic syndrome with tubular aggregates	2011	PMID: 21310273
Achondrogenesis type 1A	<i>TRIP11</i>	Golgi structure	200600	604505	Lethal achondrogenesis, deficient ossification	2010	PMID: 20089971
PGM1 - CDG	<i>PGM1</i>	Reversible conversion of Glc-1-P and Glc-6-P	614921	171900	Neurologically normal, split uvula,	2012	PMID: 22492991

Glycogen storage disease 14			612934		hepatopathy, hypoglycemia, rhabdomyolysis, dilated cardiomyopathy, cardiac arrest, malignant hyperthermia		
Hyper-IgE syndrome (HIES)	<i>PGM3</i>	Reversible conversion of GlcNAc-1-P and GlcNAc-6-P	615816	172100	Severe atopy, increased serum IgE levels, immune deficiency, autoimmunity, and motor and neurocognitive impairment	2014	PMID: 24589341 PMID: 24698316
Neutropenia, severe congenital 4	<i>G6PC3</i>	Glc-6 Phosphatase, catalytic, 3	612541	611045	Severe congenital neutropenia, recurrent infections, prominent superficial veins, cardiac abnormalities	2011	PMID: 21385794
Glycogen storage disease Ib and Ic	<i>G6PT1</i>	Glc-6-P transporter	232220 232240	602671	Neutrophil dysfunction	2011	PMID: 21385794
Non-syndromic I.D West syndrome	<i>ST3GAL3</i>	N-Acetyllactosaminide α -2,3 Sialyltransferase	611090 615006	606494	NSID (Non-syndromic intellectual disability), Infantile spasms, hypsarrhythmia	2011 2013	PMID: 21907012 PMID: 23252400
Cranio-lenticulo-sutural dysplasia (CLSD)	<i>SEC23A</i>	Golgi trafficking	607812	610511	Late-closing fontanels, sutural cataracts, facial dysmorphism, skeletal defects	2006	PMID: 16980979
Congenital Dyserythropoietic Anemia (CDA-II)	<i>SEC23B</i>	Golgi trafficking	224100	610512	Disrupted erythropoiesis with multinucleated erythroblasts in bone marrow	2009	PMID: 19561605
Autosomal Dominant Polycystic Liver Disease	<i>SEC63</i>	Golgi trafficking	174050	608648	Autosomal Dominant polycystic liver disease.	2004	PMID: 15133510

GPI Anchor Pathway

X-Linked GPI-anchor deficiency Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria	<i>PIGA</i>	GlcNAc-PI synthesis protein	300868 300818	311770	Dysmorphism, Hy, Sz, variable CNS, cardiac, urinary systems, early death Complement-mediated hemolysis	1993 2012	PMID: 8500164 PMID: 22305531
Autosomal recessive GPI-anchor deficiency	<i>PIGQ</i>	GlcNAc-PI synthesis protein	N/A	605754	Severe DD, SZ, early death	2014	PMID: 24463883
Autosomal recessive GPI-anchor deficiency	<i>PIGY</i>	GlcNAc-PI synthesis protein	616809	610662	Severe DD, SZ, early death	2015	PMID: 26293662
CHIME Syndrome Hyperphosphatasia mental retardation syndrome	<i>PIGL</i>	GlcNAc-PI de-N-Acetylase	280000	605947	ID, colobomas, heart defect, early-onset ichthyosiform dermatosis, ear anomalies (conductive hearing loss) Hyperphosphatasia mental retardation syndrome	2012	PMID: 22444671
West syndrome and	<i>PIGW</i>	Acylates the inositol ring of	616025	610275	West syndrome, hyperphosphatasia	2013	PMID: 24367057

hyperphosphatasia with mental retardation syndrome		phosphatidylinositol in GPI-anchor biosynthesis			with mental retardation syndrome		
Autosomal recessive GPI-anchor deficiency	<i>PIGM</i>	First α -Mannosyltransferase in GPI biosynthesis	610293	610273	Sz, portal vein thrombosis, portal hypertension	2006	PMID: 16767100
Hyperphosphatasia mental retardation syndrome	<i>PIGV</i>	Second α -Mannosyltransferase in GPI biosynthesis	239300	610274	Hyperphosphatasia with mental retardation syndrome 1 (HPMRS)	2010	PMID: 20802478
Autosomal recessive GPI-anchor deficiency	<i>PIGN</i>	GPI Ethanolamine Phosphate transferase 1	614080	606097	Severe neurologic impairment, Sz, lack of development, multiple congenital anomalies, early death	2011	PMID: 21493957
Hyperphosphatasia mental retardation syndrome	<i>PIGO</i>	GPI Ethanolamine Phosphate transferase 3	614749	614730	Hyperphosphatasia with mental retardation syndrome 2 (HPMRS)	2012	PMID: 22683086
Autosomal recessive GPI-anchor deficiency	<i>PIGG</i>	GPI Ethanolamine Phosphate transferase 2	N/A	N/A	DD/ID, Hy, Sz	2016	PMID: 26996948
Autosomal recessive GPI-anchor deficiency Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria	<i>PIGT</i>	GPI Transamidase complex	615398 615399	610272	ID, Hy, Sz, abnormal skeletal, endocrine, ophthalmologic abnormalities and hypophosphatasia Complement-mediated hemolysis	2013 2013	PMID: 23636107 PMID: 23733340
Autosomal recessive GPI-anchor deficiency	<i>PGAP1</i>	Lipid remodeling steps of GPI-anchor maturation	615802	611655	ID with encephalopathy	2014	PMID: 24784135
Hyperphosphatasia mental retardation syndrome	<i>PGAP2</i>	Lipid remodeling steps of GPI-anchor maturation	614207	615187	Hyperphosphatasia with mental retardation syndrome 3 (HPMRS)	2013	PMID: 23561846 PMID: 23561847
Hyperphosphatasia mental retardation syndrome	<i>PGAP3</i>	Lipid remodeling steps of GPI-anchor maturation	615716	611801	Hyperphosphatasia with mental retardation syndrome 4 (HPMRS)	2014	PMID: 24439110

Dystroglycanopathy

Walker-Warburg syndrome (MDDGA1, B1, C1)	<i>POMT1</i>	O-Mannosyltransferase	236670 613155 609308	607423	Walker-Warburg syndrome, brain malformations, various eye malformations, elevated serum CK	2002	PMID: 12369018
Walker-Warburg syndrome (MDDGA2, B2, C2)	<i>POMT2</i>	O-Mannosyltransferase	613150 613156 613158	607439	Walker-Warburg syndrome, brain malformations, various eye malformations, elevated serum CK	2005	PMID: 15894594
Muscle-eye-brain disease (MDDGA3, B3, C3)	<i>POMGNT1</i>	O-Mannosyl Glycan GlcNAc-transferase	253280 613151 613157	606822	ID, severe early-onset muscle weakness, brain malformations, various eye malformations, elevated serum CK	2001	PMID: 11709191
Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (MDDGA4, B4, C4)	<i>FKTN</i>	Ribitol-5-phosphate transferase	253800 613152 611588	607440	Hy, ID, Sz, generalized muscle weakness, elevated serum CK	1998	PMID: 9690476
Congenital muscular	<i>FKRP</i>	Fukutin-Related Protein, ribitol-5-phosphate	613153	606596	Hy, feeding difficulties, hypertrophy	2001	PMID: 11592034

dystrophy type 1C (MDDGA5, B5, C5)		transferase	606612 607155		of lower limb muscles, wasting of shoulder girdle, variable neurological involvement, elevated serum CK		
Congenital muscular dystrophy type 1D (MDDGA6, B6)	<i>LARGE</i>	Xyl and GlcA transferase	613154 608840	603590	ID, white matter changes, elevated serum CK	2003	PMID: 12966029
Walker-Warburg syndrome (MDDGA7)	<i>ISPD</i>	CDP-ribitol synthetase	614643	614631	Brain malformations, various eye malformations, elevated serum CK	2012	PMID: 22522420 PMID: 22522421
Walker-Warburg syndrome (MDDGA8)	<i>POMGNT2</i>	β 1,4 GlcNAc-transferase	614830	614828	Brain malformations, various eye malformations	2012	PMID: 22958903
Walker-Warburg syndrome (MDDGA10)	<i>TMEM5</i>	Xyl-transferase	615041	605862	Brain malformations, facial clefts, retinal dysplasia, gonadal dysgenesis.	2012	PMID: 23217329
Congenital muscular dystrophy (MDDGA11)	<i>B3GALNT2</i>	β 1,3 GalNAc-transferase 2	615181	610194	I.D, Hy, Sz, brain malformations, various eye malformations, elevated serum CK	2013	PMID: 23453667
Walker-Warburg syndrome (MDDGA12)	<i>POMK</i>	O-Man kinase	615249	615247	Walker-Warburg syndrome, brain and eye malformations, elevated serum CK	2013	PMID: 23929950 PMID: 23519211
Walker-Warburg syndrome (MDDGA13)	<i>B4GAT1</i>	β 1,4 Glucuronyltransferase	615287	605517	Hy, Sz, brain malformations, retinal dysplasia, elevated serum CK	2013	PMID: 23359570
Congenital muscular dystrophy (MDDGA14, B14, C14)	<i>GMPPB</i>	GDP-Man Pyrophosphorylase B	615350 615351 615352	615320	I.D, M, brain and eye malformations, elevated serum CK	2013	PMID: 23768512
Hereditary Inclusion body myopathy	<i>GNE</i>	UDP-GlcNAc-2-epimerase/ManAc kinase	600737 605820 269921	603824	Proximal and distal muscle weakness, wasting of the upper and lower limbs, sparing of the quadriceps	2001	PMID: 11528398

Glycosaminoglycan

Ehlers-Danlos syndrome	<i>B4GALT7</i>	β 1,4 Galactosyltransferase 7	130070	604327	Progeroid form with DD, short stature, osteopenia, defective wound healing, hypermobile joints, hypotonic muscles, loose but elastic skin	1990	PMID: 2106134
Hereditary Multiple Exostoses	<i>EXT1/EXT2</i>	GlcA/GlcNAc-transferase	133700	608177 608210	Multiple exostoses of the bone	1995	PMID: 7550340
Schneckenbecken dysplasia	<i>SLC35D1</i>	UDP-GlcA / UDP-GalNAc Golgi transporter	269250	610804	Neonatal lethal chondrodysplasia, short-limbed skeletal dysplasia	2007	PMID: 17952091

Spondylo- epimetaphyseal dysplasia	<i>PAPSS2</i>	3'-phosphoadenosine- 5'-phosphosulphate synthase	612847	603005	Short-trunk stature, skeletal dysplasia, normal intelligence, variable epiphyseal and metaphyseal changes	1998	PMID: 9771708
Achondrogenesis type 1B	<i>SLC26A2</i>	Sulphate Anion Transporter	222600 600972 256050	606718	Early death in severe cases, adults reported. Achondrogenesis Ib: usually stillborn or early death of respiratory failure. Atelosteogenesis II: pulmonary hypoplasia, fatal in infants	1996	PMID: 8528239
Spondylo- epimetaphyseal dysplasia (SED-Omani type)	<i>CHST3</i>	Chondroitin 6-O-Sulfotransferase	143095	603799	Skeletal dysplasia, normal intelligence	2004	PMID: 15215498
Macular corneal dystrophy types I / II	<i>CHST6</i>	Keratan Sulphate 6-O- Sulfotransferase	217800	605294	Corneal clouding and erosions, painful photophobia	2000	PMID: 11017086
Peeling Skin Syndrome	<i>CHST8</i>	GalNAc 4-O Sulfotransferase 1	270300	610190	Generalized superficial skin peeling from birth	2012	PMID: 22289416
Ehlers-Danlos syndrome Adducted thumb-clubfoot syndrome	<i>CHST14</i>	Dermatan sulfate GalNAc 4-O Sulfotransferase 1	601776	608429	Adducted thumb, clubfoot, progressive joint, skin laxity syndrome	2009 2010	PMID: 20004762 PMID: 20533528
Ehlers-Danlos like syndrome or SED with joint hyperlaxity	<i>B3GALT6</i>	β 1,3 Galactosyltransferase 6	271640 615349	615291	Abnormal skeletal and connective tissues lax skin, muscle hypotonia, joint dislocation, and spinal deformity	2013	PMID: 23664117
Larsen-like syndrome	<i>B3GAT3</i>	β 1,3 Glucuronyltransferase 3	245600	606374	Multiple joint dislocations, short stature, craniofacial dysmorphism and congenital heart defects	2011	PMID: 21763480
Autosomal recessive short stature syndrome	<i>XYLT1</i>	Xyl-transferase 1	615777	608124	Moderate I.D, short stature, distinct facial features, altered fat distribution	2014	PMID: 23982343
Spondylo-Ocular Syndrome with Bone Fragility, Cataracts, and Hearing Defects	<i>XYLT2</i>	Xyl-transferase 2	605822	608125	Osteoporosis, cataracts, sensorineural hearing loss, and mild learning defects	2015	PMID: 26027496
Musculocontractural type of Ehlers-Danlos syndrome	<i>DSE</i>	Dermatan sulfate epimerase	615539	605942	Characteristic facial features, congenital contractures of the thumbs and feet, hypermobility of finger, elbow, and knee joints, muscle weakness	2013	PMID: 23704329
Other							
Amish infantile epilepsy	<i>ST3GAL5</i>	Sia2,3Gal β 1,4Glc-Cer Synthase (GM3)	609056	604402	Infantile-onset epilepsy,	2004	PMID: 15502825

					developmental stagnation, blindness		
Salt and Pepper Syndrome	<i>ST3GAL5</i>	Sia2,3Gal β 1,4Glc-Cer Synthase (GM3)	609056	604402	Severe I.D, epilepsy, scoliosis, altered dermal pigmentation, choreoathetosis, dysmorphic facial features	2014	PMID: 24026681
Complex Hereditary Spastic Paraplegia	<i>B4GALNT1</i>	β 1,4 GalNAc-transferase 1	609195	601873	Early-onset spastic paraplegia, I.D, cerebellar ataxia, and peripheral neuropathy, cortical atrophy and white matter hyperintensity	2013	PMID: 23746551
Adams-Oliver Syndrome 4	<i>EOGT</i>	EGF-domain-specific O-linked O-GlcNAc transferase	615297	614789	Aplasia cutis congenita, terminal transverse limb defects	2013	PMID: 23522784
Familial Tumoral Calcinosis	<i>GALNT3</i>	Polypeptide GalNAc-transferase	211900	601756	Massive calcium deposits in skin and tissue	2004	PMID: 15133511
Tn syndrome	<i>C1GALT1C1</i>	Chaperone of β 1,3 GalT	300622	300611	Hemolytic anemia with thrombocytopenia, leukopenia	2005	PMID: 16251947
Peters plus syndrome	<i>B3GLCT</i>	β 1,3 Glucosyltransferase specific for O-Fucose on Thrombospondin type 1 repeats	261540	610308	Peters eye anomaly of the anterior chamber, ID and DD, prenatal growth delay, postnatal, typically disproportionately short, cleft lip with or without cleft palate	2006	PMID: 16909395
Dowling-Degos Disease 2	<i>POFUT1</i>	Protein O-Fucosyltransferase 1 specific for particular EGF repeats	615327	607491	Skin disorder showing reticulate hyper- and hypo-pigmentation at flexure regions such as the neck, axilla, and areas below the breasts and groin	2013	PMID: 23684010
Dowling-Degos Disease 4	<i>POGLUT1</i>	Protein O-glucosyltransferase 1 specific for particular EGF repeats	615696	615618	Skin disorder showing reticulate hyper- and hypo-pigmentation at flexure regions such as the neck, axilla, and areas below the breasts and groin	2014	PMID: 24387993
Autosomal Recessive Spondylocostal dysostoses 3	<i>LFNG</i>	Lunatic Fringe specific for O-Fucose on particular EGF repeats	609813	602576	Spondylocostal dysostosis with severe vertebral anomalies.	2006	PMID: 16385447

CDG - Congenital disorders of glycosylation

CMS - Congenital Myasthenic Syndrome

Dol - Dolichol

ID - Intellectual Disability

Sz - Seizures

Hy - Hypotonia
M - Microcephaly
DD - Developmental delay
NSID - Non-syndromic intellectual disability
CK - Creatine kinase



ASSOCIAÇÃO DAS PIONEIRAS
SOCIAIS-DF/ REDE SARAH



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização das estruturas de N-glicanos das moléculas de glicoproteínas, por espectrometria de massa (MS), nos distúrbios congênitos de glicosilação tipo II (CDG-II)

Pesquisador: Nilza do Carmo Fontes **Área**

Temática:

Versão: 2

CAAE: 48316815.8.0000.0022

Instituição Proponente: ASSOCIACAO DAS PIONEIRAS SOCIAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.266.412

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo tipo caso-controle para análise comparativa, por espectrometria de massa, de estruturas de N-glicanos das moléculas de glicoconjugados do plasma de pessoas portadoras e não portadoras de distúrbios congênitos de glicosilação tipo II (CDG II) avaliados na Rede SARAH de Hospitais de Reabilitação.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar as diferenças estruturais e, através das mesmas, reconhecer possíveis espectros específicos de glicanos alterados para cada tipo de CDG II, auxiliando o diagnóstico. O outro objetivo será determinar a faixa de variação das abundâncias relativas das estruturas de glicanos, para estabelecimento de valores de referência da população normal e determinação de estruturas e de massas dos glicanos e suas abundâncias relativas nos indivíduos com CDG tipo II.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se observa riscos evidentes para os pacientes e/ou para o grupo controle de pacientes em seguimento ambulatorial, uma vez que a coleta do material para a pesquisa será realizada também

Endereço: SMHS Quadra 501 Conjunto A

Bairro: SMHS

CEP: 70.335-901

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3319-1494

Fax: (61)3319-1261

E-mail: comiteeticapesquisa@sarah.br



Continuação do Parecer: 1.266.412

para outros exames complementares de assistência.

A pesquisa poderá auxiliar na implementação desta metodologia na rotina laboratorial do diagnóstico de CDG tipo II.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está bem delineada e irá estudar um grupo de pacientes com uma doença rara ainda em entendimento da fisiopatologia da doença.

Foi elaborado um TCLE adequado para os pacientes com CDG e outro TCLE para o grupo controle. Os termos estão com redação adequada.

Foi explicado como será o local e a abordagem dos indivíduos controles.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão com o redação e nível de linguagem apropriados e com a assinatura e contato do pesquisador.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem restrições do ponto de vista ético.

Considerações Finais a critério do CEP:

Liberado após adequações.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_558861.pdf	28/09/2015 08:41:43		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Paciente.pdf	28/09/2015 08:38:37	Nilza do Carmo Fontes	Aceito

Endereço: SMHS Quadra 501 Conjunto A

Bairro: SMHS

CEP: 70.335-901

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3319-1494

Fax: (61)3319-1261

E-mail: comiteeticapesquisa@sarah.br



ASSOCIAÇÃO DAS PIONEIRAS
SOCIAIS-DF/ REDE SARAH



TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Controle.pdf	28/09/2015 08:36:08	Nilza do Carmo Fontes	Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.PDF	30/07/2015 09:22:24		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto.doc	30/07/2015 09:07:02		Aceito

Página 02 de

Continuação do Parecer: 1.266.412

Investigador	Projeto.doc	30/07/2015 09:07:02		Aceito
--------------	-------------	------------------------	--	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 07 de Outubro de 2015

Assinado por:
Mauren Alexandra Sampaio
(Coordenador)

Endereço: SMHS Quadra 501 Conjunto A

Bairro: SMHS

CEP: 70.335-901

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3319-1494

Fax: (61)3319-1261

E-mail: comiteeticapesquisa@sarah.br



ASSOCIAÇÃO DAS PIONEIRAS
SOCIAIS-DF/ REDE SARAH



Página 03 de

Endereço: SMHS Quadra 501 Conjunto A

Bairro: SMHS

CEP: 70.335-901

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3319-1494

Fax: (61)3319-1261

E-mail: comiteeticapesquisa@sarah.br